



**Universidade de
Aveiro**
Ano 2010

Departamento de Química

Sara Almeida Ferro

**Validação de Métodos Cromatográficos
para a Análise de Medicamentos**



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Química

Sara Almeida Ferro

**Validação de Métodos
Cromatográficos para a Análise de
Medicamentos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira, Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira
Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dra. Cláudia Gama
Directora do Laboratório de Controlo de Qualidade da Bluepharma

Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro
Professor auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

agradecimentos

Ao terminar este trabalho, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que, durante a sua realização, manifestaram, de diversas formas, o seu apoio e estímulo. A todos um Muito Obrigada!

Ao Professor João Oliveira, na qualidade de orientador de estágio, pela orientação científica, pelos conselhos e ajuda prestada.

Á Bluepharma, especialmente ao Professor Sérgio Simões, pelo modo como que me acolheu e pela oportunidade que me proporcionou ao poder colaborar com esta empresa.

Á Dra. Cláudia Gama, co-orientadora, pela orientação científica, pelo optimismo e simpatia sempre demonstrados.

Á Sandra, pela ajuda, transmissão dos seus conhecimentos que tanto me auxiliaram na elaboração de todo este trabalho.

Agradeço também a todos aqueles com quem partilhei os laboratórios de Controlo de Qualidade e Investigação e Desenvolvimento, pela partilha de conhecimentos e experiências, pela companhia e bom ambiente proporcionados.

Finalmente, quero agradecer ao João, aos meus pais, aos meus irmãos pelo apoio incondicional e toda a paciência perante todos os momentos mais difíceis.

palavras-chave

Validação Analítica, Quantificação, Limite de especificação, Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

resumo

Este trabalho consistiu em validar dois métodos cromatográficos que permitissem controlar a concentração de alguns dos compostos existentes na formulação de um medicamento com o princípio activo X. Neste sentido foi validado um método destinado à quantificação do composto Y, um antioxidante presente na formulação e, um outro método que permite avaliar o perfil de impurezas na mesma forma farmacêutica.

Os métodos utilizados foram facultados por um cliente da Bluepharma e pretendia-se validar estes dois métodos de forma a aplicá-los posteriormente nas análises de rotina do medicamento do composto X. Para cada método foram avaliados os parâmetros pré-definidos para o processo de validação. Foram realizados testes de estabilidade, selectividade, precisão do sistema, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e recuperação, que permitiram constatar que o método analítico cedido pelo cliente reproduzirá resultados precisos e fiáveis.

Para o método do conteúdo do composto Y, foi obtida uma estabilidade de 72 horas para os padrões e apenas 24 horas para as amostras. Estes tempos garantem que seja feita uma análise cujas soluções utilizadas não apresentem qualquer alteração das suas características originais. No estudo da filtração, também para este método, concluiu-se que o sistema de filtros PVDF do fornecedor Millipore e Nylon do fornecedor VWR são os mais adequados comparativamente com o outro tipo de filtro estudado, uma vez que os resultados não apresentam uma diferença significativa relativamente à

solução não filtrada ($p > 0,05$), com um desvio inferior a 2%. Em relação à recuperação da substância activa nos níveis de concentração 60%, 100% e 140%, verificou-se que o método permite obedecer aos limites de especificação (97%-103%), cujas recuperações obtidas foram de 100.40%, 100.24% e 100.00%, respectivamente. Esta avaliação permitiu concluir que o método é exacto.

No método de validação das impurezas do composto X, também os filtros PVDF e Nylon foram os que menos interferiram nas soluções filtradas para a generalidade das impurezas analisadas. A análise da estabilidade da solução padrão foi de 24 horas, tendo-se obtido um desvio de 0,84% em relação à injeção feita ao tempo 0 horas. Em relação às soluções da fórmula reconstituída verificou-se que não se consegue estabelecer um tempo de estabilidade em relação à impureza A, pois obteve-se um desvio superior à especificação após 1,5 horas da primeira injeção. Concluiu-se que de futuro, as amostras devem ser injectadas logo depois de preparadas. A partir das análises realizadas para estabelecer os limites de detecção e quantificação foi possível concluir-se que o método permite detectar amostras com concentrações de $1,20 \times 10^{-5}$ mg/ml (0.003%), apesar de só conseguir quantificar, com rigor e precisão, amostras de concentrações iguais ou superiores a $2,40 \times 10^{-3}$ mg/ml (0.006%).

A avaliação de todos os parâmetros permitirão em análises futuras, no Controlo de Qualidade, identificar e quantificar o composto Y, bem como as impurezas presentes no medicamento do composto X.

Neste sentido, o composto Y e as impurezas presentes na forma farmacêutica são quantificados de forma exacta, precisa, linear e selectiva (não há influência da substância activa, nem dos excipientes).

keywords

Analytical Validation, Quantification, Specification Limit, High Performance Liquid Chromatography.

abstract

This work consisted in the validation of two chromatographic methods that allow control some of the existing compounds in the formulation of a drug with the compound X. So in this sense was validated a method to quantify the Y compound, an antioxidant necessary for the formulation of the drug, and another method to evaluate the impurities expected in the same drug of the compound X.

The methods used were provided by a supplied of Bluepharma and sought to validate these two methods in order to apply them later in routine analysis of the drug compound X. For each method were evaluated pre-defined parameters for the validation process. Were performed tests of stability, selectivity, system precision, detection and quantification limits, linearity and recovery, which showed evidence that the analytical method given by the costumer, will provide accurate and reliable results.

For the assay method of the compound Y was obtained a stability of 72 hours for the standards and only 24 hours for the samples. By analyzing solutions within these times, it is guaranteed that there is no significant change on their behavior. In the filtration study, also for this method, it was concluded that the filter system supplier Millipore PVDF and supplier Millipore PVDF are more appropriate compared to other type of filters studied, since the results do not show a significant difference compared to the unfiltered solution ($p > 0,05$), with a deviation of less than 2%. Regarding to the accuracy test, the analysis of concentration the levels of 60%, 100% and 140%,

showed results criterion in the specification limits (97%-103%): 100,40%, 100,24% and 100,00% respectively.

In the method validation of impurities of compound X, PVDF and Nylon filters showed less interference for the analysis of the impurities evaluated regarding to the other filter brands tested. The stability analysis of standard solution was 24 hours, with a deviation of 0,84% compared to the injection made at time 0 hours. In relation to the solutions of reconstituted formula, it was found that the solutions are not stable regarding to the impurity A, since a deviation greater than the specification was verified 1,5 hours after the first injection. It was concluded that in future, the analysis of tablets, should be injected immediately after preparation. From the analysis carried out to establish the limits of detection and quantification was possible to verify that the method can detect samples with concentrations of $1,20 \times 10^{-5}$ mg/ml (0.003%), despite only quantify with accuracy and precision, sample concentrations equal to or greater than $2,40 \times 10^{-5}$ mg/ml (0.006%).

The evaluation of all parameters will, in future analysis of Quality Control, identify and quantify the compound Y and the known impurities present in drug containing the compound X. In these sense, both the method of content of the compound Y, as the method of impurities in the drug compound X, are quantified without suffering the influence of the active substance or other excipients, presenting the results an acceptable reproducibility and linear.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	19
ÍNDICE DE FIGURAS.....	23
ÍNDICE DE TABELAS.....	25
GLOSSÁRIO.....	27
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	29
1.1 INTRODUÇÃO	29
CAPÍTULO 2 – BOAS PRÁTICAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	31
2.1 INTRODUÇÃO	31
2.2 GLOBALIZAÇÃO E A NECESSIDADE DE NORMAS GERAIS	32
2.3 CONTROLO DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS	33
CAPÍTULO 3 – ESTATINAS	35
3.1 O DISTÚRBIO DA DISLIPIDÉMIA	35
3.2 METABOLISMO DOS LÍPIDOS	36
3.2.1 Biosíntese do colesterol	38
3.2.2 Estatinas.....	39
3.3 PRODUTO FARMACÊUTICO E COMPOSTOS ALVO DA VALIDAÇÃO.....	41
3.3.1 Produto X.....	41
3.3.2 Composto Y.....	41
3.3.3 Compostos Relacionados.....	42
3.3.4 Validação de métodos.....	44
CAPÍTULO 4 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO.....	45
4.1 FUNDAMENTOS TEÓRICO - PRÁTICOS.....	45
4.2 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICOS.....	45
4.2.1 Cromatografia líquida em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência.....	47

4.2.1.1	Cromatografia de adsorção.....	48
4.2.1.1.1	<u>Cromatografia de fase normal</u>	49
4.2.1.1.2	<u>Cromatografia de fase reversa</u>	49
4.2.1.2	Cromatografia de troca iónica.....	50
4.2.1.3	Cromatografia de gel/exclusão.....	52
4.2.1.4	Cromatografia de partição.....	54
4.2.2	Equipamento de Cromatografia Líquida.....	54
4.2.2.1	Bombas.....	55
4.2.2.2	Injectores.....	55
4.2.2.3	Sistemas de eluição gradiente.....	56
4.2.2.4	Pré-coluna.....	56
4.2.2.5	Colunas e Forno.....	56
4.2.2.6	Suportes sólidos.....	57
4.2.2.7	Detectores.....	58
4.2.2.8	Processador de dados.....	59
4.2.2.9	Reservatório de eluente.....	59
4.2.2.10	Fases móveis.....	60
4.2.2.11	Fases estacionárias.....	60
4.2.3	Mecanismos de retenção.....	61
4.2.4	Testes de conformidade do sistema.....	61
4.2.4.1	Resolução.....	62
4.2.4.2	Número de pratos teóricos.....	63
4.2.4.3	Factor de simetria e o factor de arrastamento.....	64
4.2.4.4	Factor de retenção.....	66
4.2.4.5	Factor de capacidade.....	66
4.2.4.6	Precisão/Repetibilidade.....	67
4.2.4.7	Exactidão do método.....	67
CAPÍTULO 5 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....		69
5.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	69
5.2	TIPO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS A VALIDAR.....	70
5.3	PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO.....	71

5.3.1.1	Identificação	72
5.3.1.2	Teste de conteúdo e impurezas	72
5.3.2	Linearidade	73
5.3.3	Gama de trabalho	73
5.3.4	Exactidão	74
5.3.4.1	Conteúdo.....	75
5.3.4.2	Impurezas (Quantificação)	75
5.3.5	Precisão.....	75
5.3.5.1	Repetibilidade.....	76
5.3.5.2	Precisão intermédia.....	77
5.3.5.3	Reprodutibilidade	77
5.3.6	Limite de detecção e limite de quantificação	78
5.3.6.1	Baseados numa avaliação visual.....	78
5.3.6.2	Baseados na razão sinal/ruído	78
5.3.6.3	Baseados no desvio padrão de resposta e no declive.....	79
5.3.7	Robustez	80
5.3.7.1	Estabilidade das soluções	81
CAPÍTULO 6 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO		83
6.1	CALIBRAÇÃO E PADRÕES DE REFERÊNCIA	83
6.2	PROCEDIMENTO E CÁLCULOS MATEMÁTICOS.....	84
CAPÍTULO 7 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....		87
7.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	87
7.1.1	Reagentes.....	87
7.1.2	Equipamentos	87
7.1.3	Padrões	88
7.1.4	Material auxiliar	88
7.2	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES	89
7.2.1	Preparação das soluções para a validação do método de conteúdo do composto Y	89
7.2.2	Preparação das soluções para a validação do método de impurezas do composto X.....	91

7.3	CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS	94
7.3.1	Condições de validação do método do conteúdo do composto Y	94
7.3.2	Condições de validação do método das impurezas do composto X.....	95
CAPÍTULO 8 – RESULTADOS E DISCUSSÃO		97
8.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DA ANÁLISE DO CONTEÚDO DO COMPOSTO Y.....	97
8.1.1	Filtração das soluções.....	97
8.1.2	Selectividade	99
8.1.3	Linearidade.....	103
8.1.4	Exactidão.....	105
8.1.5	Precisão do sistema	108
8.1.6	Repetibilidade/Precisão do método.....	109
8.1.7	Estabilidade das soluções	110
8.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE IMPUREZAS DO COMPOSTO X	112
8.2.1	Filtração.....	113
8.2.2	Selectividade	114
8.2.3	Precisão do sistema	118
8.2.4	Eficiência do sistema.....	119
8.2.5	LOD e LOQ.....	120
8.2.6	Linearidade.....	123
8.2.7	Estabilidade das soluções	125
CAPÍTULO 9 - CONCLUSÃO		129
BIBLIOGRAFIA.....		131

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Transporte dos lípidos e lipoproteína no organismo.</i> ⁽⁸⁾	37
<i>Figura 2 - Regulação da síntese do colesterol mediada pela absorção alimentar.</i> ⁽⁸⁾	38
<i>Figura 3 - Estrutura das estatinas mais conhecidas.</i> ⁽¹⁴⁾	40
<i>Figura 4 - Classificação dos métodos cromatográficos.</i>	46
<i>Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de uma cromatografia de troca iónica.</i> ⁽²¹⁾	51
<i>Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de uma cromatografia de gel.</i> ⁽²¹⁾	52
<i>Figura 7- Representação esquemática dos componentes do equipamento de Cromatografia Líquida.</i> ⁽²⁴⁾	54
<i>Figura 8 - Bomba de HPLC.</i>	55
<i>Figura 9 - Injector de HPLC.</i>	55
<i>Figura 10 - Pré-coluna e coluna de HPLC.</i>	56
<i>Figura 11 - Pré-coluna e coluna de HPLC.</i>	57
<i>Figura 12 - Esquema de um cromatograma ilustrativo do cálculo da resolução, número de pratos teóricos, factor de simetria e factor de retenção.</i> ⁽²⁸⁾	63
<i>Figura 13 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica.</i> ⁽³⁾	64
<i>Figura 14 - Esquema de um cromatograma ilustrativo para o cálculo do factor de simetria.</i> ⁽³¹⁾	65
<i>Figura 15 - Esquema de um cromatograma ilustrativo para o cálculo do factor de arrastamento.</i> ⁽²⁷⁾	65
<i>Figura 16 - Esquema de um pico de HPLC com vários factores de simetria.</i> ⁽³¹⁾	66
<i>Figura 17 - Representação gráfica da determinação da razão sinal/ruído.</i> ⁽²⁷⁾	79
<i>Figura 18 - Cromatograma obtido pela da solução do branco.</i>	100
<i>Figura 19 - Cromatograma obtido da solução padrão do composto X.</i>	100
<i>Figura 20 - Cromatograma obtido da solução padrão do composto Y.</i>	101
<i>Figura 21 - Cromatograma obtido da solução de excipientes.</i>	101
<i>Figura 22 - Cromatograma obtido da solução da fórmula reconstituída.</i>	102
<i>Figura 23 - Representação gráfica dos resultados obtidos nas várias concentrações que permitiu obter a recta de linearidade do método analítico.</i>	104
<i>Figura 24 - Cromatograma de uma amostra analisada num equipamento Waters.</i>	115

<i>Figura 25 - Cromatograma de uma amostra analisada por um equipamento Shimadzu.</i>	<i>115</i>
<i>Figura 26 - Cromatograma de uma injeção do branco (solvente).</i>	<i>116</i>
<i>Figura 27 - Cromatograma que representa o padrão do composto X.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 28 - Cromatograma de uma injeção dos excipientes presentes na formulação..</i>	<i>117</i>
<i>Figura 29 - Cromatograma da solução padrão de mistura de impurezas conhecidas fortificadas.</i>	<i>117</i>
<i>Figura 30 - Cromatograma de uma mistura contendo os excipientes, as impurezas fortificadas e o composto activo.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 31 - Cromatograma auxiliar no cálculo da Razão sinal/ruído para o limite de detecção.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 32 - Razão sinal/ruído da concentração do limite de detecção.</i>	<i>121</i>
<i>Figura 33 - Gráfico obtido dos resultados das áreas vs concentração das soluções preparadas.</i>	<i>124</i>

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Valores limites. ⁽¹⁸⁾</i>	43
<i>Tabela 2 - Comparação de alguns factores entre a cromatografia líquida em coluna tradicional e o HPLC. ⁽²¹⁾</i>	48
<i>Tabela 3 - Tipos de ligantes das fases estacionárias. ⁽²⁷⁾</i>	60
<i>Tabela 4 - Parâmetros analisados para os métodos de validação de identificação, teste de impurezas e conteúdo. ⁽³⁾</i>	71
<i>Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas no método de conteúdo do composto conservante Y.....</i>	94
<i>Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas no método de validação das impurezas do composto X.</i>	95
<i>Tabela 7- Resultados das soluções não filtradas e filtradas com filtros GHP Pall, PVDF Millipore e Nylon VWR com 0,45µm.....</i>	98
<i>Tabela 8 - Resumo dos dados obtidos pelos cromatogramas em análise.</i>	103
<i>Tabela 9 - Resultados obtidos das injecções das soluções relativos à linearidade.</i>	104
<i>Tabela 10 - Resumo das recuperações obtidas nos três níveis de concentração.....</i>	106
<i>Tabela 11 - Intervalos de confiança encontrados para cada nível de concentração.....</i>	107
<i>Tabela 12 - Resultados das 5 injecções obtidas nas 3 diferentes soluções de composto Y a uma concentração de 4 µg/ml.....</i>	108
<i>Tabela 13 - Resultados das 5 injecções obtidas nas 3 diferentes soluções de composto Y a uma concentração de 3,8 µg/ml.....</i>	109
<i>Tabela 14 - Resultados da repetibilidade do procedimento analítico de quantificação do composto Y.....</i>	110
<i>Tabela 15 - Resultados das soluções padrão do composto Y analisadas aos tempos 0h e 72h.</i>	111
<i>Tabela 16 - Resultados das soluções da fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h e 24.</i>	111
<i>Tabela 17- Resultados das soluções da fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h e 48.</i>	112
<i>Tabela 18 - Resultados obtidos pelas filtrações.....</i>	114

<i>Tabela 19- Áreas obtidas das seis injeções da solução padrão a uma concentração de 0,002mg/mL.....</i>	<i>118</i>
<i>Tabela 20 - Resultados obtidos nas seis injeções do padrão a 0,5%......</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 21 - Resultados relativos à análise da razão sinal/ruído do Limite de detecção.</i>	<i>122</i>
<i>Tabela 22 - Resultados relativos à análise da recuperação do limite de quantificação.</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 23 - Resultados obtidos no estudo da linearidade.</i>	<i>124</i>
<i>Tabela 24 - Resultados da estabilidade da solução padrão do composto X.....</i>	<i>126</i>
<i>Tabela 25 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída.</i>	<i>126</i>
<i>Tabela 26 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza A.....</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 27 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza C.</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 28 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza D.</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 29 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza E.....</i>	<i>128</i>

GLOSSÁRIO

Abreviaturas

ACAT – Acetil lecitina-colesterol transferase
AVC – Acidente vascular cerebral
FDA – Food and drug administration
GHP – polipropileno hidrofílico
GMP – Boas Práticas de Fabrico (Good manufacturing practices)
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HMG – Grupo hidroximetilglutarílico
HMG-CoA – β -hidroxil- β -metilglutaril-CoA
HPLC – Cromatografia de Alta Pressão (High performance liquid chromatography)
ICH – International Conference on Harmonization
ISO – International Standard for Organization
LD – Limite de detecção
LDI – Lipoproteína de densidade intermédia
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LQ – Limite de quantificação
OHSAS – Occupational Health and Safety Assessment Services
PDG – Pharmacopoeial Discussion Group
PVDF – Polivinideno flúor
RSD – Desvio padrão relativo (Residual Standard Deviation)
USP – United States Pharmacopeia
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

Notação geral

\bar{x} - média aritmética das determinações
 μg – microgramas
 μL – microlitros
 μm – micrómetros
 A_{RF} – Área da fórmula reconstituída
 A_{st} – Área do pico da solução padrão

CI- Intervalo Confiança (Confidence Interval)

cm - centímetros

C_P - Concentração real da solução padrão (mg/ml ou µg/ml)

C_{RF} – Concentração do composto na fórmula reconstituída

C_{RF} – Concentração do composto na fórmula reconstituída (mg/ml)

C_{St} – Concentração do padrão do composto (mg/ml)

cv – coeficiente de variação

α – Factor de retenção

H – Altura do prato teórico

K' – Factor de capacidade

L – Comprimento da coluna

mg – miligrama

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

mV – milivoltes

N – Números de pratos teóricos

Peso P – Peso do padrão

pH – símbolo para a grandeza físico-química potencial hidrogenónico

r – coeficiente de correlação

R – Resolução

RF – Factor de resposta

s – desvio padrão relativo

t₀ – Tempo morto

t_R – Tempo de retenção

UV – ultra violeta

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

W_h, W_{0,5} – Largura a meia altura do pico a meia altura (peak width at half height)

σ – desvio padrão absoluto

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

Este trabalho foi realizado no laboratório do controlo de qualidade da empresa Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. situada em Coimbra. A Bluepharma é uma empresa farmacêutica que tem por missão a investigação, o desenvolvimento, o fabrico e a comercialização de medicamentos, a preços competitivos, garantindo contudo um nível de qualidade de excelência, contribuindo assim, para a melhoria da qualidade de vida das populações.

Esta empresa certificada, compromete-se a garantir não só a qualidade dos seus produtos fabricados e distribuídos, mas também a respeitar o meio ambiente e a salvaguardar as condições de trabalho dos seus colaboradores, através da implementação de um sistema de Qualidade, Ambiente, Higiene e Segurança, apoiado pelas Normas ISO 9001, ISO 14001, OHSAS 18001, Boas Práticas de Fabrico (GMP) e por outras legislações aplicáveis.

O controlo de qualidade, não se limita apenas a garantir a aplicação das boas práticas de fabrico no que respeita a amostragem, as especificações e os ensaios, mas também está responsável de toda a organização, documentação e procedimentos, que comprovem a conformidade do processo, bem como de todos os materiais utilizados na produção de medicamentos. Nos dias de hoje, é exigido às empresas garantir e comprovar a qualidade e a credibilidade dos seus resultados analíticos. Neste sentido, qualquer método ou procedimento que é utilizado para avaliar uma matéria-prima, um produto ou um qualquer material a estes relacionados, deve ser validado de forma a demonstrar que os resultados obtidos são adequados para o fim a que se destinam.

A utilização de métodos cromatográficos, nomeadamente a técnica de Cromatografia de Alta Pressão (HPLC), permite separar, identificar e quantificar compostos existentes num medicamento ou em qualquer formulação que possa comprometer a qualidade do produto final.

Neste trabalho foram validados dois métodos analíticos por HPLC, de um produto farmacêutico, nomeadamente um método de substâncias relacionadas e outro do conteúdo de um dos conservantes utilizados neste produto.

CAPÍTULO 2 – BOAS PRÁTICAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

2.1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XIX tem havido uma crescente preocupação em assegurar a qualidade de produção, armazenamento e venda dos produtos alimentares bem como dos medicamentos, a fim de evitar episódios de adulteração, que possam colocar em risco os seus consumidores.

De forma a proteger os consumidores contra a fraude, foi exigido às indústrias um controlo mais rigoroso dos seus produtos. Em meados da década de 1960, a Food and Drug Administration (FDA) começou a trabalhar em projectos de regulamentação de Boas Práticas de Fabrico, conhecidas como GMP (do inglês “Good Manufacturing Practice”) que consistiam num conjunto de normas, directrizes e recomendações, que garantissem um grau de exigência de qualidade, segurança e eficácia durante todo o processo de desenvolvimento, fabrico e controlo dos alimentos e medicamentos. ⁽¹⁾

Em Julho de 2002, a “FDA Food GMP” formou um grupo de trabalho que pretendia examinar a eficácia dos procedimentos aplicados desde 1986, não só sobre o impacto das Boas Práticas, mas também sobre os regulamentos em vigor. ⁽¹⁾

Actualmente estes regulamentos são reconhecidos internacionalmente e exigem que, no caso concreto dos medicamentos, as instalações, o controlo do processo de fabrico, o embalamento e o armazenamento, estejam de acordo com as boas práticas e, que os medicamentos cumpram a lei, em termos de segurança e possuam a identidade, a potência, a qualidade e a pureza características especificadas. Neste sentido, os regulamentos das GMPs preocupam-se com critérios específicos para o programa de garantia de qualidade, edifícios, equipamentos, pessoal, componentes e registos de produção de lotes, procedimentos de fabrico e controlo, embalagens de produtos, rotulagem, controlos laboratoriais, registos de distribuição, estabilidade, registos de reclamações, recolhas de produto e auto-inspecções. ⁽¹⁾

2.2 GLOBALIZAÇÃO E A NECESSIDADE DE NORMAS GERAIS

A globalização dos mercados tem afectado de forma significativa a indústria farmacêutica. Actualmente, os medicamentos são desenvolvidos para mercados globais e neste sentido, as GMPs são um instrumento indispensável para impulsionar a exportação dos produtos, uma vez que, estas normas reconhecidas internacionalmente, são exigidas por vários países para a importação e comercialização dos mesmos. Porém, cada país tem autoridades reguladoras próprias, que definem os requisitos necessários para testar os medicamentos, em termos de controlo de qualidade, especificações e métodos, o que provoca um dispêndio em termos temporais, económicos e laborais bastante elevados. ⁽²⁾

Atendendo ao desenvolvimento comercial a nível mundial de medicamentos, em 1992, foi desenvolvido pela Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) (fundada em 1990 e composta por autoridades reguladoras e peritos da indústria farmacêutica da Europa, Japão e Estados Unidos), um conjunto de recomendações divulgadas pela Conferência Internacional de Harmonização (“International Conference on Harmonization” - ICH), no sentido de conciliar a interpretação e aplicação das normas e requisitos do registo dos produtos nestas regiões. O objectivo é fazer um uso mais económico das fontes humanas, animais e materiais, evitar atrasos no desenvolvimento e na disponibilidade de novos medicamentos, mantendo porém, exactamente os mesmos padrões de qualidade, segurança e eficácia estabelecidos. Podem contudo, haver ocasiões em que não existe um único texto correspondente às três regiões da PDG, sendo utilizadas as referências em vigor em cada país, como por exemplo as Guias de aprovação da “*United States Pharmacopeia*” (USP) e, a nível europeu as monografias da Farmacopeia Europeia. ⁽³⁾

As recomendações publicadas pela ICH têm vindo a ser actualizadas atendendo à evolução das técnicas industriais e aos requisitos que vão sendo adicionados e exigidos nas várias etapas do desenvolvimento dos métodos e processos. Baseado nestes pressupostos, em 1994, foi apresentado pela FDA um guia específico sobre métodos de validação cromatográficos. ⁽²⁾

Em Portugal, foi publicada a Portaria n°42/92, de 23 de Janeiro em 1991 que aprova o “Guia para o Bom Fabrico de Medicamentos”, que estabelece os princípios e normas do bom fabrico de medicamentos de uso humano. ⁽⁴⁾

2.3 CONTROLO DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

O conceito de garantia de qualidade (do inglês “Quality Assurance”) surgiu na sequência das recomendações apresentadas pela ICH e, englobam todos os sistemas que podem, directa ou indirectamente, influenciar a qualidade de um produto.

A “International Standard for Organization” (ISO) apresentou uma série de sistemas de garantia de qualidade, nomeadamente as ISO 9000 que, de uma forma generalizada permitem um benefício do produtor e do consumidor. A informação obtida pelas GMPs permite um bom suporte ao sistema de qualidade já implementado no sentido de melhorar o funcionamento geral de uma empresa.

O controlo de qualidade é responsável pela aplicação das boas práticas de fabrico que contemplam não só a amostragem, especificações e ensaios, mas todos os aspectos relacionados com a organização, documentação e procedimentos, de forma a comprovar a conformidade do medicamento mediante as especificações e não permitindo a comercialização de produtos onde não tenha sido aprovada a sua qualidade. ⁽⁵⁾

Em termos práticos, a garantia de qualidade descreve as medidas gerais implementadas pelo laboratório para assegurar e regular a qualidade, enquanto o controlo de qualidade descreve as medidas individuais para monitorizar e controlar uma operação analítica em particular. ⁽⁶⁾

Inicialmente o controlo de qualidade era apenas restrito à qualidade das matérias-primas. Com a crescente preocupação na qualidade dos produtos comercializados, a indústria farmacêutica passou a realizar análises, não só às matérias-primas mas também ao produto final e a certas etapas durante o fabrico, designadas de controlo em processo, que permitem avaliar o desempenho de cada etapa e não apenas a verificação dos requisitos estabelecidos. ⁽⁵⁾

CAPÍTULO 3 – ESTATINAS

3.10 DISTÚRPIO DA DISLIPIDÉMIA

A dislipidémia é um distúrbio no mecanismo dos lípidos, sendo o mais comum a hiperlipidémia, caracterizada principalmente por níveis elevados de colesterol (colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL)) e dos triglicéridos no sangue.⁽⁷⁾

A hipercolesterolemia é uma das principais causas de morte nas sociedades industrializadas, devido á oclusão das artérias coronárias. O aumento da concentração do colesterol no sangue leva a acumulação deste nos vasos sanguíneos (placas ateroscleróticas) levando à obstrução dos vasos (aterosclerose).⁽⁸⁾

A LDL é uma lipoproteína que transporta o colesterol no sangue para diversos tecidos, contudo quando em concentrações intracelulares elevadas, pode começar a depositar-se nas paredes internas de vasos sanguíneos de grande e médio tamanho, formando lesões ateroscleróticas, chamadas de ateromas. Estas placas consistem em depósitos de gorduras, principalmente de colesterol, mas também plaquetas, macrófagos, células musculares deterioradas e outros tecidos, no interior das artérias, reduzindo o fluxo de sangue. Se algum destes fragmentos de placas se solta pode obstruir vasos pequenos e, estimular o aparecimento de doenças como acidentes vasculares cerebrais (AVC), enfarte de miocárdio, doença vascular periférica, angina do peito, morte súbita ou insuficiência cardíaca.⁽⁸⁾

As placas tornam-se maiores e mais numerosas com a idade e principalmente nos homens, contudo, factores como antecedentes familiares de hiperlipidémia, obesidade, uma dieta com alto conteúdo de gorduras, falta de exercício, menopausa, consumo moderado a elevado de álcool, fumar, a diabetes mal controlada e uma glândula da tiróide hipoactiva podem contribuir para uma disfunção lipídica.

Geralmente e numa fase inicial de níveis elevados de colesterol e triglicéridos, é recomendado um tratamento à base da dieta e exercício físico, e se for o caso, deixar de fumar. Só depois, se necessário, tomar um medicamento que reduza os lípidos.⁽⁹⁾

3.2 METABOLISMO DOS LÍPIDOS

Os lípidos são no nosso dia-a-dia designados por gordura, e são ricos em energia essencial em vários processos metabólicos do organismo. Existem vários tipos de lípidos que diferem entre si, pelos seus grupos funcionais e consequentemente nas suas funções no organismo, sendo os mais importantes, o colesterol e os triglicéridos. O colesterol é um componente essencial em todas as membranas celulares e é precursor das hormonas esteróides e na síntese dos sais biliares, enquanto os triglicéridos são responsáveis pelo armazenamento e transporte da energia pelo organismo. ⁽⁷⁾

A característica geral dos lípidos é serem insolúveis em água. Por isso, quando entram na corrente sanguínea, estes utilizam certas proteínas, para se deslocarem pelo organismo. A esta combinação gordura-proteína dá-se o nome de lipoproteína. De uma maneira geral, as lipoproteínas são complexos macromoleculares esféricos, compostos por um núcleo hidrofóbico contendo triglicéridos e ésteres de colesterol e por uma superfície hidrofílica composta por fosfolípidos, colesterol livre e proteínas (apolipoproteínas). ⁽⁸⁾

Apesar de estarem relacionadas as lipoproteínas podem ser subclassificadas segundo a sua estrutura e função, considerando as diferentes densidades concedidas pela composição em lípidos e apoproteínas. As principais lipoproteínas são os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). ⁽⁸⁾

Apesar dos lípidos serem ingeridos todos os dias na dieta, são na sua grande parte produzidos pelo organismo, principalmente pelo fígado. São portanto, considerados dois sistemas interligados que metabolizam as lipoproteínas (uma via exógena e outra endógena). ⁽⁸⁾

A via exógena é a responsável pela obtenção dos lípidos a partir da dieta. Os ácidos gordos são absorvidos e convertidos em triglicéridos no intestino delgado e são incorporados em lipoproteínas sintetizadas no retículo endoplasmático das células “quilomícrons”, que os transportam pela corrente sanguínea. Na circulação, os triglicéridos vão sendo removidos pela acção da proteína lipase. Esta deslipidação dá origem aos quilomícrons remanescentes que são transportados ao fígado e aos ácidos gordos que são libertados em diferentes tecidos, de forma a serem utilizados em mecanismos celulares ou

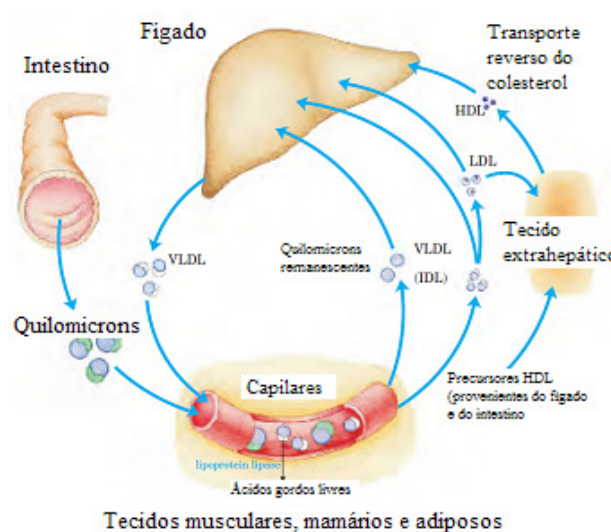


Figura 1 - Transporte dos lípidos e lipoproteína no organismo.⁽⁸⁾

Os lípidos que chegam ao fígado pelos quilomícrons remanescentes ou por outras lipoproteínas, são transformados em VLDL e entram novamente em circulação, onde, quando necessário, sofrem deslipidações pela acção da lipoproteína lipase originando uma série de outras lipoproteínas que se diferenciam pela sua composição e densidade.

Por essa razão, as partículas de HDL podem provir do fígado ou do intestino e são inicialmente partículas pequenas contendo algum colesterol e várias apolipoproteínas, principalmente a acetil lecitina-colesterol transferase (ACAT) que catalisa a formação de ésteres de colesterol a partir do colesterol e da lecitina proveniente dos quilomícrons e dos VLDLs ou a partir de colesterol armazenado nos tecidos. Quando os HDL já estão bastante carregados de ésteres de colesterol são dirigidos ao fígado onde o colesterol é libertado e excretado ou convertido em ácidos biliares.⁽⁸⁾

Considerando assim as funções das lipoproteínas, é vulgarmente considerado o colesterol das LDLs como sendo nocivo ao organismo, aumentando o risco de doenças cardiovasculares e o colesterol das HDLs como sendo “bom” ao organismo, por transportar os ésteres de colesterol, removendo-os dos tecidos periféricos e devolvendo-o ao fígado de forma a ser excretado.⁽⁸⁾

3.2.1 Biosíntese do colesterol

A síntese do colesterol é um processo complexo com um grande gasto energético, por isso, é importante conhecer o mecanismo que regula a síntese do colesterol que é obtido pela dieta.

A síntese do colesterol é regulada pela concentração do colesterol intracelular segundo o mecanismo apresentado na figura seguinte, onde o passo limitante é a conversão da β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em Mevalonato, por acção da HMG-redutase. ⁽⁸⁾

Existem três vias que possibilitam o controlo da síntese de colesterol: pela inibição do gene da enzima HMG-redutase, pela regulação a nível hormonal (baseada nas concentrações de glucagon e insulina) e pela activação da ACAT, Figura 2. ⁽⁸⁾

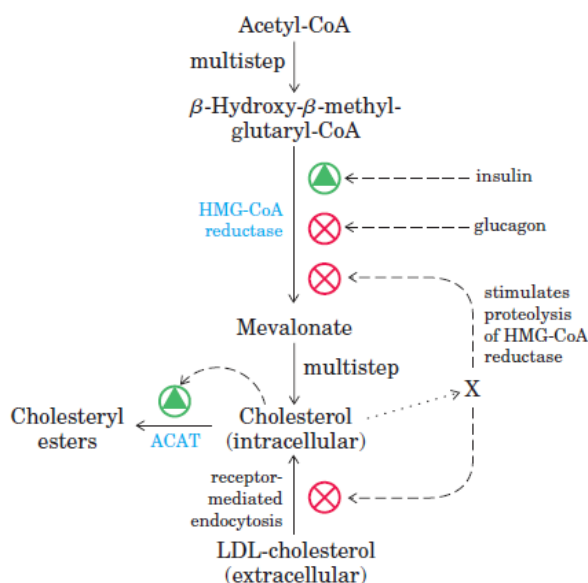


Figura 2 - Regulação da síntese do colesterol mediada pela absorção alimentar. ⁽⁸⁾

A presença intracelular de altos níveis de um esteroide não identificado (colesterol ou seu derivado) promove uma rápida degradação da enzima HMG-redutase e inibição da transcrição do seu gene. Não sendo produzida esta enzima, então o passo da conversão da β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) em Mevalonato não poderá ocorrer. Os

medicamentos utilizados para inibir este passo limitante na produção de colesterol são vulgarmente conhecidas como estatinas.⁽⁸⁾

3.2.2 Estatinas

As estatinas (ou inibidores da HMG-CoA) são uma classe de medicamentos usados para baixar o nível plasmático de colesterol, principalmente em casos de hipercolesterolemia, devido à semelhança a nível molecular da enzima HMA-CoA, que é a enzima limitante da via mevalonato da síntese do colesterol. A inibição da enzima HMA-CoA leva à diminuição da síntese do colesterol no fígado e ao aumento da síntese de receptores LDL, resultando num aumento da depuração de lipoproteína de baixa densidade no sangue. Estudos realizados nos últimos anos têm provado que as estatinas são eficazes na diminuição de efeitos cardiovasculares e nas taxas da mortalidade.^(10, 11)

Jesse Huff e seus colegas na Merck começaram a investigar a biossíntese de colesterol no início dos anos 50 e confirmaram que o ácido mevalónico era um intermediário na biossíntese do colesterol. Em 1956, o ácido mevalónico foi isolado a partir de um extrato de levedura por Karl Folkers e Carl Hoffman. Em 1959, foi descoberta a enzima HMG-CoA redutase (principal contribuinte de produção do colesterol), o que incentivou a pesquisa de um composto capaz de a inibir.⁽¹²⁾

Em 1976, Akira Endo isolou a partir do fungo *Penicillium citrinium*, a Mevastatina (Compactin, ML-236B), que seria o primeiro inibidor da enzima a ser testado. Em 1979, Hoffman e seus colegas isolaram a Mevinolina (composto semelhante à mevastatina, mas mais potente) a partir do fungo *Aspergillus terreus*, a qual é actualmente conhecida como Lovastatina. Em 1987, a Lovastatina foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico, enquanto a Mevastatina foi abandonada devido a problemas na morfologia intestinal e toxicidade encontrada em animais em estudo.⁽¹²⁾

Durante a investigação do composto da Lovastatina, cientistas da Merck, sintetizaram um inibidor da HMG-CoA redutase, derivado da fermentação do *Aspergillus terreus*, que foi designado por MK-733, que viria a ser nomeado de Sinvastatina. A Sinvastatina é então muito semelhante à Lovastatina, variando a sua estrutura apenas num

grupo metil (substituição da cadeia do grupo 2-metilbutiril da Lovastatina pelo grupo 2,2,-metilbutiril), o que aumenta substancialmente a sua potência. ⁽¹²⁾

A introdução de novos derivados, totalmente sintéticos, da classe das estatinas ocorreu em 1994, 1997 e 1998, com o aparecimento da Fluvastatina, Atorvastatina e Cerivastatina, respectivamente. ⁽¹²⁾

O fígado é o órgão onde as estatinas mais actuam e por isso, encontram-se em maior concentração, contudo, outros tecidos são expostos a uma quantidade variável e significativa destes compostos pela corrente sanguínea. Actualmente, apesar dos vários trabalhos que apresentam os benefícios das estatinas nos tratamentos de doenças coronárias, e os seus efeitos na diminuição do colesterol, o uso excessivo e prolongado destes medicamentos tem provocado algumas controvérsias. ⁽¹³⁾

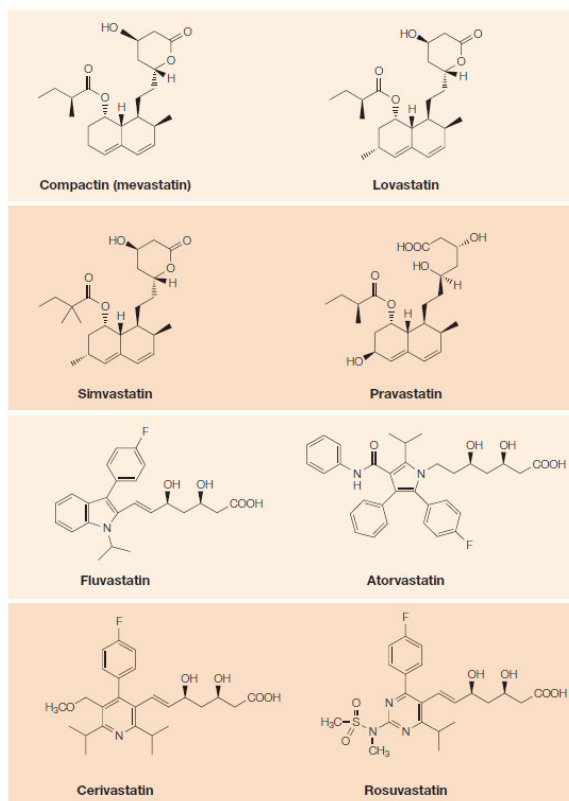


Figura 3 - Estrutura das estatinas mais conhecidas. ⁽¹⁴⁾

Existem, hoje em dia, uma série de estatinas empregadas clinicamente: Lovastatina (natural), Simvastatina e a Pravastatina (derivadas de um processo semi-sintético a partir da fermentação do fungo *Aspergillus terreus* e, portanto de estrutura semelhante à

Lovastatina), e Fluvastatina, Cerivastatina e Atorvastatina (totalmente sintetizadas e que apresentam estruturas completamente diferentes), Figura 3. ⁽¹⁵⁾

Todas as estatinas possuem um grupo hidroximetilglutarílico (HMG), que se liga na mesma região enzimática do grupo HMG do substrato, bloqueando o seu acesso ao sítio catalítico. ⁽¹⁶⁾

3.3 PRODUTO FARMACÊUTICO E COMPOSTOS ALVO DA VALIDAÇÃO

Todos os medicamentos são sujeitos ao mesmo tipo de avaliação para a sua introdução no mercado, tendo que se respeitar e comprovar exigências de qualidade, segurança e eficácia.

O produto analisado pertence à classe das estatinas, contudo de forma a não comprometer o seu carácter confidencial, será designada de forma codificada bem como todos os compostos relacionados.

3.3.1 Produto X

O produto X é um fármaco pertencente à classe das estatinas, utilizado para a hipercolesterolemia e portanto permite diminuir a lipoproteína de baixa densidade e, consequentemente prevenir doenças cardiovasculares. É um pó cristalino branco, praticamente insolúvel em água e em hexano. Contudo é solúvel em metanol (200 mg/mL), etanol (160 mg/mL), acetonitrilo, clorofórmio (610 mg/mL), dimetilsulfóxido (540 mg/mL). ⁽¹⁷⁾

3.3.2 Composto Y

O composto Y é um antioxidante e conservante com algumas propriedades antimicrobianas, muito utilizado em alimentos, cosméticos e medicamentos. Na sua forma

pura é um pó cristalino branco ou por vezes com um aspecto de cera branca amarelada, com um ligeiro odor, característico dos compostos aromáticos. É, normalmente insolúvel em água, mas solúvel em metanol, etanol e propilenoglicol. ⁽¹⁷⁾

Este composto é então utilizado como conservante devido às suas características anti-oxidantes e por isso encontra-se na formulação do produto X.

3.3.3 Compostos Relacionados

A qualidade dos medicamentos constitui um factor fundamental para assegurar a sua eficácia e minimizar a ocorrência de efeitos indesejados decorrentes da presença de impurezas e/ou produtos de degradação. Assim, pode-se afirmar que a determinação da pureza dos produtos é essencial e consiste numa actividade de rotina no controlo de qualidade de medicamentos.

É importante definir o perfil aceitável para o uso pretendido sem comprometer a sua segurança e eficácia terapêutica. Portanto, uma das importantes estratégias para evitar ou monitorar a presença destas impurezas, trata-se justamente de conhecer ou especular suas possíveis origens (por exemplo, através de estudos de degradação forçada) e desta forma encontrar as melhores condições analíticas de controlo. ⁽¹⁸⁾

As impurezas podem ser classificadas em impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. As impurezas orgânicas são normalmente provenientes de processos de produção e armazenamento, enquanto que as impurezas inorgânicas são na sua maioria provenientes apenas de processos de produção. Contudo todas as impurezas orgânicas ou inorgânicas devem ser controladas tendo em conta as origens das substâncias activas contidas nos medicamentos. ⁽¹⁸⁾

Designa-se por impureza qualquer composto existente numa fórmula farmacêutica para além do princípio activo que o compõe e excipientes, são exemplos, todos os produtos de reacção, produtos intermédios, materiais de partida, reagentes, catalisadores, conservantes ou produtos de síntese ou de degradação. ⁽¹⁸⁾

Todas as impurezas orgânicas e inorgânicas presentes nos produtos finais são qualificadas do ponto de vista da sua inocuidade no teor máximo autorizado (dose diária máxima).

Existem uma série de impurezas presentes num dado produto final que podem ser classificados quanto à sua origem e quanto à sua detecção. Tendo estes factores em conta, podem ser classificadas como:

Impurezas detectáveis: todas as potenciais impurezas de estrutura definida, capazes de serem detectadas pelos ensaios qualitativos, mas que não se encontram a concentrações superiores ao limiar de identificação.

Impureza identificada: impureza cuja caracterização estrutural foi realizada.

Impureza não identificada: impureza cuja caracterização estrutural não foi realizada e que é unicamente definida por propriedades analíticas de ordem qualitativa, como por exemplo pelo tempo de retenção.

Impureza não especificada: impureza limitada por um critério de aceitação e não individualmente citada com um critério de aceitação específico.

Impureza potencial: impureza teoricamente susceptível de aparecer quando da produção ou da conservação. Pode ou não estar efectivamente presente na substância.

Impureza especificada: impureza individualmente citada e limitada por um critério de aceitação específico. Uma impureza especificada pode ser ou não ser identificada.⁽¹⁸⁾

A avaliação das impurezas deve ser expressa de forma quantitativa e apresentados quaisquer resultados que se encontrem acima do limite a reportar, Tabela 1. No cálculo dos limites a reportar não interessa qual o princípio activo do produto nem a sua dose (excepto quando a dose do princípio activo determina a dose do próprio produto). A dose diária máxima do produto é calculada a partir da frequência da toma e do peso médio de cada forma farmacêutica.

Tabela 1 – Valores limites.⁽¹⁸⁾

Dose diária máxima ¹	Limite reportado ²	Limite de identificação ³	Limite de Quantificação
≤ 2g/dia	0.05%	0.10% ou consumo de 1.0 mg por dia (o que for menor)	0.15% ou consumo de 1.0 mg por dia (o que for menor)
> 2g/dia	0.03%	0.05%	0.05%

1 A quantidade de fármaco administrado por dia

2 Limites reportados mais elevados deve ser cientificamente justificados

3 Limites mais baixos podem ser apropriados se a impureza é extraordinariamente tóxica

3.3.4 Validação de métodos

O uso das Farmacopeias é indispensável para garantir um controlo adequado tanto do composto activo, como de outros compostos indispensáveis como os conservantes, mas também impurezas que possam estar presentes, nomeadamente as impurezas de degradação e as de síntese.

A validação do método de doseamento do princípio activo ou de um outro componente presente numa fórmula farmacêutica, permite quantificar com precisão e exactidão esse composto de forma a garantir que este se encontra com o conteúdo (teor) especificado.

A validação de métodos para a quantificação de impurezas tem sido alvo de investigação de forma a garantir que a quantificação das impurezas existentes (substâncias relacionadas com o produto activo) é feita de forma a assegurar que estas substâncias se encontram em níveis aceitáveis para os utilizadores.

De forma a assegurar um controlo adequado tanto dos princípios activos, com o dos componentes importantes para a conservação do produto na fórmula farmacêutica, ou no controlo das impurezas, a sua análise é baseada num método quantitativo, como por exemplo, cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou electroforese capilar.

Neste trabalho tanto a validação do método do conteúdo, para doseamento do composto Y como para a validação do método de quantificação das impurezas do composto X foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

CAPÍTULO 4 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO

4.1 FUNDAMENTOS TEÓRICO - PRÁTICOS

Devido à sua selectividade, sensibilidade e versatilidade dos seus detectores, as técnicas de Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) - do inglês “High Performance Liquid Chromatography” - são frequentemente utilizadas para analisar misturas ou compostos de medicamentos.

Cada método cromatográfico possui um campo de aplicabilidade mais ou menos específico e, para que a sua utilização seja a mais adequada, é fundamental o conhecimento dos seus princípios, as vantagens e, sobretudo, as limitações mais relevantes de cada um deles. Torna-se, por isso, indispensável conhecer as propriedades estereoquímicas e polaridades do composto a analisar, de forma a seleccionar a técnica que melhor o identifique e caracterize. ⁽⁵⁾

A escolha do método analítico apropriado para a caracterização das amostras em estudo, deve ter em consideração factores como: o tipo de informação pretendida; a quantidade de amostra disponível; a exactidão e a precisão do método analítico; as interferências analíticas e o seu controlo; a existência de possíveis contaminações; o tempo e o custo necessário para a análise. ⁽¹⁹⁾

4.2 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICOS

Nos últimos anos os métodos cromatográficos têm ganho uma importância significativa em estudos farmacêuticos a nível Europeu. A técnica de HPLC permite várias aplicações, incluindo separação, identificação, purificação e quantificação de vários compostos, sendo considerada nos dias de hoje, uma das principais técnicas de análises de medicamentos.

Em 1903, M. S. Tsvet apresentou o seu primeiro trabalho (actualmente designado por cromatografia de adsorção) que consiste na separação de pigmentos cloroplastos e outras

substâncias através dos adsorventes situados numa coluna de vidro. Em 1906, o mesmo autor apresentou os conceitos de cromatografia e cromatograma. O primeiro conceito é baseado na palavra grega “croma” que significa cor e “grafia” referente a escrita. Cromatograma é a representação gráfica da concentração de um soluto em estudo, em função do tempo, volume ou distância gastos no eluente. Idealmente o cromatograma é representado por picos gausseanos sob uma linha de base. ⁽²⁰⁾

A cromatografia é uma técnica através da qual os componentes de uma amostra são separados fisicamente, permitindo a sua identificação e quantificação. Os componentes da amostra percorrem um meio adequado com o qual interactivam fisicamente (fase estacionária) arrastados por um fluído adequado (fase móvel). A separação resulta na diferença das velocidades dos componentes arrastados pelo solvente, dependendo das diferentes interacções (cargas, tamanhos moleculares, polaridades, afinidades específicas ou solubilidades) com a fase estacionária. As diferentes interacções entre cada um dos analitos e as duas fases resultam em diferentes velocidades no percurso (tempo de retenção), emergindo do meio a tempos diferentes. ⁽²¹⁾

Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos cromatográficos, sendo os mais importantes a cromatografia de camada fina, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida, existindo algumas variantes destes métodos. ⁽²¹⁾

Os diversos processos são nomeados de acordo com o estado físico da fase móvel e da fase estacionária e subclassificados segundo o mecanismo de separação do método cromatográfico. Na figura 4 estão representados as diversas classificações atendendo ao estado da fase móvel. ⁽²¹⁾

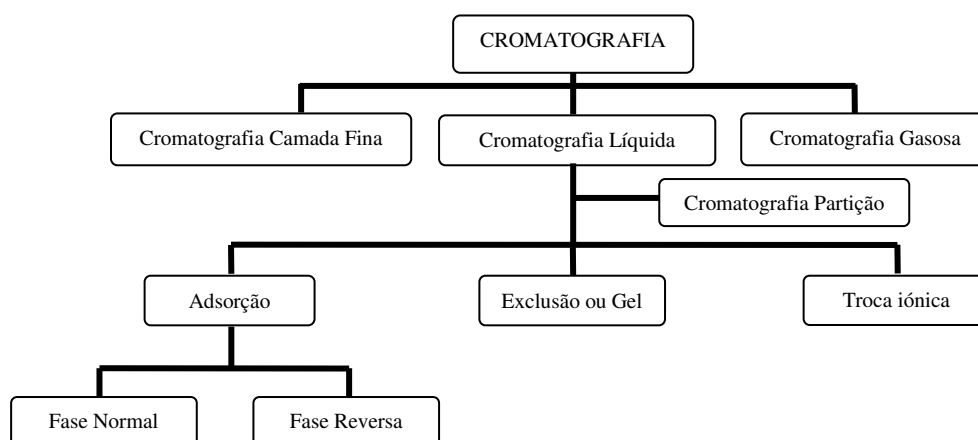


Figura 4 - Classificação dos métodos cromatográficos.

Tendo em conta a cromatografia líquida podem ser classificados quatro tipos principais:

- **Cromatografia de adsorção** - a separação é baseada nas diferenças de afinidade dos componentes da amostra pela superfície da fase estacionária.
- **Cromatografia de troca iónica** - baseia-se nas diferentes trocas dos componentes iónicos ou ionizados com iões de uma matriz estacionária.
- **Cromatografia de exclusão ou em gel** - baseia-se nos efeitos de exclusão da fase estacionária sobre as moléculas de dimensões ou forma diferentes.
- **Cromatografia de partição** - baseia-se na diferente solubilidade dos componentes da mistura em relação a duas fases líquidas não miscíveis.

4.2.1 Cromatografia líquida em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência

Este tipo de cromatografia é realizado numa coluna na qual a fase estacionária é um enchimento sólido (cromatografia de adsorção, troca iónica, bioafinidade e em gel) ou uma fase líquida aderente a este (cromatografia de partição), sendo em qualquer um dos casos, fase móvel líquida. ⁽²¹⁾

O movimento da fase líquida ao longo da coluna ocorre, tradicionalmente, por acção da gravidade (sendo a eluição relativamente lenta, decorrendo com frequência durante várias horas), ou sob altas pressões, designada por cromatografia líquida de alta eficiência ou HPLC. Na tabela 2 estão apresentadas algumas das diferenças encontradas entre a cromatografia de coluna líquida tradicional e o HPLC. ⁽²¹⁾

Devido às suas características de selectividade e sensibilidade, a cromatografia de HPLC é uma excelente técnica que permite uma análise de separação, identificação e quantificação de compostos numa amostra (em baixas concentrações).

Existem como já referido várias formas de classificar a cromatografia líquida em coluna, considerando a natureza da fase estacionária e o processo de separação.

Tabela 2 - Comparação de alguns factores entre a cromatografia líquida em coluna tradicional e o HPLC. ⁽²¹⁾

	CL clássica em coluna	HPLC
Enchimento	Não reutilizável Partículas relativamente grandes Em coluna aberta	Reutilizável Partículas reduzidas dimensões Em coluna fechada
Aplicação da amostra	Adição cuidadosa ao topo do eluente na coluna	Injecção (por seringa ou válvula)
Fluxo do eluente	Por acção da gravidade	Sob pressão, por acção de bombas de alta pressão. Controlável
Deteccção	Descontínua (fracções individuais de eluato)	Contínua
Duração	Várias horas	Vários minutos
Resolução Reprodutibilidade Precisão Exactidão	Inferiores	Superiores
Exigência de trabalho humano	Superiores	Inferiores
Possibilidade de automatização	Reduzida, parciais	Elevado
Custo	Reduzido	Elevado

4.2.1.1 Cromatografia de adsorção

Esta técnica baseia-se nas interacções entre as moléculas dos solutos de fase móvel líquida e a superfície de um sólido adsorvente (fase estacionária). ⁽²¹⁾

Como desvantagens desta técnica podem citar-se o aparecimento de caudas nos picos e a dificuldade de reprodução da actividade da fase estacionária, sobretudo quando se recorre ao uso de agentes desactivadores. Entre os vários adsorventes possíveis em cromatografia de adsorção líquido-sólido, a alumina e a sílica, são os mais utilizados, sob a forma de grânulos porosos ou peliculares. ⁽²¹⁾

A cromatografia de adsorção em coluna encontra aplicação sobretudo na separação, segundo a polaridade e a posição do grupo funcional. Dependendo da polaridade da fase móvel e da estacionária, este tipo de cromatografia pode ser normal ou de fase reversa. ⁽²¹⁾

Quando a afinidade é entre compostos polares, diz-se que a cromatografia é de fase “normal”, e os compostos apolares são os primeiros a eluir. Contudo se são introduzidas cadeias alquil ligadas covalentemente à matriz da coluna, o sentido de inversão é invertido,

sendo por isso designada por cromatografia de “fase reversa”. Neste caso são eluídos em primeiro lugar as moléculas polares, sendo as apolares retidas na coluna.⁽²²⁾

4.2.1.1.1 Cromatografia de fase normal

A cromatografia de fase normal é caracterizada pelo uso de uma fase estacionária polar (por exemplo sílica, mas também pode ser de vidro poroso ou alumina) e de uma fase móvel não polar (por exemplo hexano ou tetrahidrofurano) e é usada quando o componente a separar é equitativamente polar.⁽²²⁾

O componente polar é fortemente atraído para a superfície polar da fase estacionária. Quanto maior a polaridade dos compostos maior a força de adsorção e consequentemente maior o tempo de retenção. A fase móvel mais polar diminui o tempo de retenção enquanto as fases móveis mais hidrofóbicas tendem a aumentar o tempo de retenção. Solventes muito polares podem desactivar a coluna por obstrução da superfície da fase estacionária.⁽²³⁾

Esta técnica é utilizada para separar isómeros estereoquímicos, diastêromos, compostos aromáticos com baixos pesos moleculares e compostos com longas cadeias alifáticas.⁽²²⁾

4.2.1.1.2 Cromatografia de fase reversa

Na indústria farmacêutica, a fase reversa é bastante utilizada devido aos compostos analisados serem maioritariamente polares e altamente solúveis em água. A cromatografia de fase reversa é um método cromatográfico que utiliza moléculas não polares na fase estacionária (hidrofóbica) e fases móveis moderadamente polares (mistura de uma solução aquosa e um solvente orgânico, como metanol e acetonitrilo, como moduladores). Estes solventes reduzem a polaridade e consequentemente diminuem o tempo de retenção, ou seja existe uma maior retenção das moléculas de natureza não polar, enquanto que as moléculas polares eluem mais rapidamente. O tempo de retenção é aumentado pela adição de solvente polar à fase móvel e diminui por adição de solvente mais hidrofóbico.⁽²²⁾

São introduzidos grupos alquil ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) sendo os comprimentos da cadeia mais comuns os C_3 , C_4 , C_8 , C_{18} ligados à sílica (produzindo uma fase estacionária não polar), contudo grupos amino, ciano e fenilo podem também ser utilizados. ⁽²²⁾

A cromatografia de fase reversa é bastante versátil, rápida e altamente reprodutível, sendo a sua eficiência dependente da polaridade, pH, solubilidade e das características físico-químicas do soluto. ⁽²²⁾

4.2.1.2 Cromatografia de troca iónica

Esta técnica permite fundamentalmente separar iões existentes numa solução (fase móvel) por troca de iões do mesmo sinal de grupos funcionais iónicos, em geral, numa matriz sólida (fase estacionária). ⁽²⁴⁾

Este processo é utilizado exclusivamente para a separação de amostras iónicas ou ionizáveis e a separação é baseada na polaridade da amostra. A separação dos analitos por cromatografia de troca iónica é baseada na incorporação de grupos funcionais na coluna de cromatografia de cargas opostas às cargas a separar, de forma que os componentes são selectivamente adsorvidos da fase móvel. Designa-se cromatografia de troca catiónica, quando se separam compostos de carga positiva e, cromatografia aniónica quando os compostos a separar são de carga negativa. Os componentes são depois eluídos por deslocamento de outros iões com o mesmo tipo de carga, mas com maior força de interacção com a fase estacionária. Esta afinidade entre a fase móvel com a matriz pode ser controlada pelo pH, força iónica, temperatura ou concentração dos compostos. ⁽²⁴⁾

Geralmente a fase móvel utilizada em troca iónica é aquosa, tamponizada a pH conveniente, e de força iónica adequada. O pH e a força iónica da solução constituem parâmetros importantes que, em geral, devem ser controlados. O pH influencia a ionização do grupo funcional do suporte permutador (condicionando a sua capacidade), e é dependente da concentração de grupos iónicos na matriz e na ionização da mistura (a qual pode intervir em relações laterais de ácido-base). Por outro lado, um aumento da força iónica da solução (por aumento da concentração da solução-tampão ou por adição de um electrólito) conduz a uma diminuição da retenção dos componentes da amostra, dada a competição dos restantes iões da solução com os grupos que permutam da resina. ⁽²⁴⁾

Como representado na Figura 5, os grupos funcionais sobre a superfície estacionária são fixados pelas suas cargas positivas (M^+). O equilíbrio destes grupos funcionais é garantido pela neutralização com grupos funcionais de cargas negativas presentes na fase móvel (C^-). Quando ocorre uma injeção de uma amostra com uma afinidade superior à superfície da fase estacionária (A^-), ocorre a troca de iões carregados negativamente, ficando assim na coluna os iões A^- ligados a M^+ . A remoção destes iões A^- é feita seguindo o mesmo processo, ou seja por injeção de uma solução com uma afinidade superior ou concentração superior comparativamente com os iões existentes. Este equilíbrio pode ser descrito segundo a equação: ⁽²²⁾

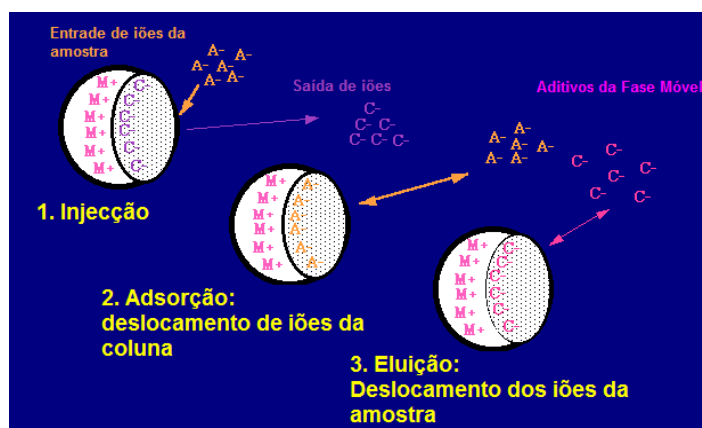
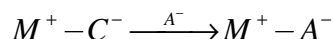


Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de uma cromatografia de troca iónica. ⁽²¹⁾

A distribuição de equilíbrio é determinada pela concorrência entre os componentes da amostra e os aniões da fase móvel, sobre os locais de interacção da fase estacionária. Deve ser mantida a electroneutralidade dentro da coluna para que a estereoquímica seja mantida, de modo que um anião A^- desloque um ião C^- .

No caso de uma cromatografia catiónica o processo é idêntico, todavia a fase estacionária está revestida de iões negativos e o solvente carregado positivamente.

4.2.1.3 Cromatografia de gel/exclusão

Este tipo de cromatografia, permite separar espécies que não são suficientemente voláteis para aplicação da cromatografia gasosa e, cujas solubilidades, polaridades, e características de adsorção não diferem suficientemente para a aplicação efectiva das restantes técnicas de cromatografia líquida. Na cromatografia em gel, a separação é realizada segundo o tamanho das moléculas por recorrência ao uso de um gel que funciona de crivo molecular. Durante a passagem da amostra através dos grânulos do gel, as moléculas dos componentes de dimensões superiores aos poros deste, não penetram no seu interior (designa-se em geral por limite de exclusão do gel o peso molecular mínimo – mais rigorosamente seria a dimensão mínima – das moléculas que não podem penetrar nos poros do gel), dependem todo o tempo na fase móvel e são as primeiras a ser eluídas pelo fluxo de solvente. Os componentes de moléculas de dimensões inferiores a todos os poros dos grânulos do gel, poderão penetrar nestes, sofrendo uma retardação máxima, enquanto as moléculas dos componentes com dimensões compreendidas na gama dos poros do gel, poderão penetrar numa fracção destes sofrendo retardação intermédia, Figura 6. ⁽²⁰⁾

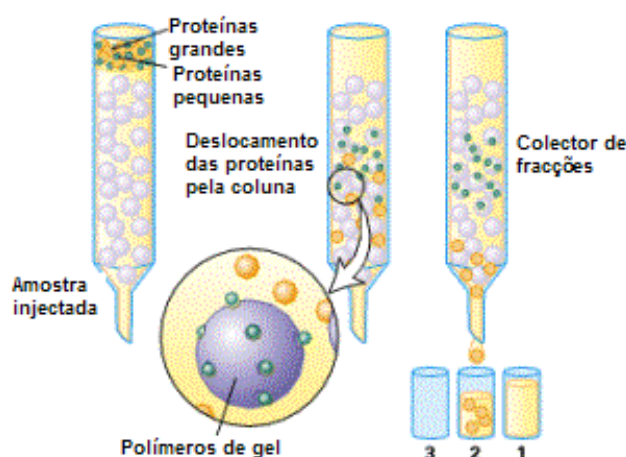


Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de uma cromatografia de gel. ⁽²¹⁾

A vantagem desta técnica, é permitir uma boa separação de moléculas com um volume mínimo de eluente, sem alterar a sua actividade biológica, contudo a gama de

massa a ser separada, deve ter uma diferença mínima de 10% produzindo um número limitado de moléculas separadas. A técnica de cromatografia de exclusão de tamanho ou cromatografia em gel é amplamente utilizada para a purificação e análise de pesos moleculares de polímeros sintéticos e biológicos, tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos.⁽²⁰⁾

De um modo geral, a fase sólida em cromatografia de gel, apresentada sob forma granular, deve ser química e mecanicamente resistente e apresentar uma porosidade controlada e uniforme. A aplicação do gel é condicionada não só pelos diâmetros dos poros, mas também pelos diâmetros dos grânulos. Assim, o aumento do grau dos grânulos, conduz simultaneamente à diminuição do tempo da separação e à resolução.

Podem ser considerados dois tipos fundamentais de géis: xerogéis e aerogéis. Os xerogéis são géis propriamente ditos, formados por partículas de polímeros orgânicos de grau de cruzamento controlado que absorvem solvente e aumentam de volume (mantendo a sua individualidade) formando uma estrutura porosa relativamente mole a qual colapsa por remoção daquele. Pelo contrário, os aerogéis, impropriamente considerados de géis, são sólidos porosos rígidos, inorgânicos, que não colapsam por remoção do solvente absorvido.

Esta técnica apresenta como vantagens, para além da elevada reprodutibilidade, a separação simples de componentes de pesos moleculares diferentes (em geral superiores a 2000Da), com um só solvente e sem necessidade de eluição por gradiente. As separações são rápidas e de duração previsível (entre os tempos correspondentes às exclusões total e mínima) o que favorece, por exemplo, a automatização da aplicação de amostras e a determinação de pesos moleculares dos solutos com base nos tempos de retenção.

Devido à rápida duração das separações, só um número relativamente reduzido de componentes pode ser eluído segundo bandas distintas. Outra limitação desta técnica, é o peso molecular dos componentes a separar, que têm de diferir entre si, de modo a que haja uma boa separação. A cromatografia de afinidade apresenta uma reduzida versatilidade de parâmetros experimentais na fase móvel, e é apenas a natureza do gel estacionário que deve ser alterada no caso de se pretender melhorar a separação.

Na indústria farmacêutica, as técnicas de cromatografia líquida mais utilizadas são as cromatografias de fase normal e fase reversa.

4.2.1.4 Cromatografia de partição

A cromatografia de partição baseia-se na diferente solubilidade dos componentes da mistura em relação a duas fases líquidas não miscíveis. Este é um processo de separação de misturas em contracorrente desenvolvido inicialmente para separar aminoácidos e logo aplicado a muitas outras substâncias. A fase estacionária é um líquido aquoso que contém uma substância inerte, insolúvel e hidratada, como a sílica gel, através da qual flui a fase móvel. A fase móvel consiste num solvente imiscível com o líquido da fase estacionária, que contém a mistura a separar.

4.2.2 Equipamento de Cromatografia Líquida

Na Figura 7 encontra-se representado um típico sistema de Cromatografia Líquida onde é possível identificar os componentes instrumentais e químicos. Os componentes instrumentais são a bomba, o injetor, a coluna, o forno (com controlo de temperatura), o detector e o sistema de processamento de dados, enquanto os componentes químicos são as fases móveis e fase estacionária. ⁽²³⁾

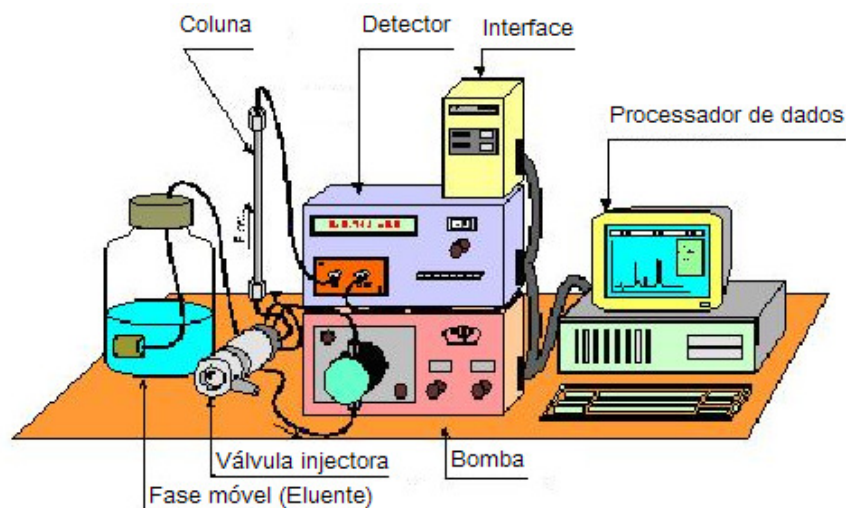


Figura 7- Representação esquemática dos componentes do equipamento de Cromatografia Líquida. ⁽²⁴⁾

A amostra é introduzida na coluna e atravessa-a devido ao fluxo contínuo e sob pressão da fase móvel que a vai arrastando pelas partículas de enchimento. A migração do

soluto é dependente da termodinâmica e das propriedades cinéticas do soluto para com a fase estacionária.⁽²³⁾

4.2.2.1 Bombas

A bomba utilizada em HPLC deve ser capaz de fornecer, através da coluna, um fluxo de solvente contínuo, Figura 8. Hoje em dia, as bombas são compostas de êmbolos com válvulas de regulação que controlam o fluxo com uma maior precisão. Há dois tipos de bombas com estas características: as pneumáticas e as mecânicas, capazes de controlar a pressão e manter o fluxo constante, respectivamente.⁽²²⁾



Figura 8 - Bomba de HPLC.

4.2.2.2 Injectores

A amostra é normalmente dissolvida no eluente que constitui a fase móvel, sendo a solução aplicada ao fluxo de eluente no injetor à entrada da coluna, Figura 9. A introdução da amostra no HPLC é através de uma micro-seringa por pressão de gás ou acção de um pistão de uma válvula injetora. O conteúdo da seringa é depois depositado na corrente de fluxo da fase móvel entrando na coluna.⁽²²⁾

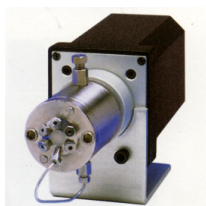


Figura 9 - Injetor de HPLC.

4.2.2.3 Sistemas de eluição gradiente

A variação da composição do eluente, susceptível de programação e automatização, pode ser realizada por dois tipos principais de técnicas: mistura prévia dos solventes à pressão atmosférica, seguida de bombeamento e compressão da solução final para a coluna, ou bombeamento e compressão dos solventes individualmente seguida por uma mistura a altas pressões. ⁽²²⁾

4.2.2.4 Pré-coluna

A pré-coluna, como o nome indica, é colocada antes da coluna como mostra a Figura 10. Esta unidade de equipamento, de grande importância em cromatografia líquido-líquido, contém um enchimento com a mesma fase estacionária que a coluna analítica, funcionando como saturador do eluente e impedindo assim o seu arrastamento na coluna analítica. A pré-coluna serve também como filtro a contaminantes e a partículas de poeiras, proporcionando um aumento de vida da coluna mas sem alterar os resultados cromatográficos. ⁽²²⁾



Figura 10 - Pré-coluna e coluna de HPLC.

4.2.2.5 Colunas e Forno

As colunas de HPLC podem apresentar um comprimento de 10 a 30 cm com um diâmetro interno de 2 a 5 mm, Figura 11. Dependendo do diâmetro, as micropartículas que a coluna contém (fase estacionária) podem ser de 3 a 10 μm . O forno consiste numa

câmara termostática de circulação de ar, para controlar a temperatura da coluna durante a análise.⁽²²⁾



Figura 11 - Pré-coluna e coluna de HPLC.

4.2.2.6 Suportes sólidos

Os suportes sólidos, são enchimentos utilizados dentro da coluna, que permitem os diversos tipos de separações. Estes podem ser porosos, microporosos, esféricos, partículas de formas irregulares ou partículas de revestimento, com propriedades especiais, contendo grupos funcionais acoplados, que lhes permitem uma selectividade e uma maior interacção para com os solutos.

As partículas rígidas permitem a análise a pressões muito elevadas, sendo aplicáveis quer em cromatografia líquido-líquido, quer em líquido-sólido, com grande eficiência. As partículas totalmente porosas apresentam, em geral, uma alta capacidade de amostra dada a sua extensa área superficial. São relativamente baratas mas, para diâmetro superiores a 10 µm, a sua eficiência e a rigidez de separação são relativamente baixas. Para reduzir estas dificuldades, recorre-se a micropartículas totalmente porosas, de menores dimensões (5-19 µm, as quais porém, apresentam um custo superior) ou a partículas peliculares formadas por um núcleo sólido esférico revestido de uma fina camada porosa de espessura típica igual a 1/30 do diâmetro da partícula.⁽²²⁾

Os suportes sólidos da fase estacionária em cromatografia líquido-líquido de alta pressão devem ser inactivos, apresentar áreas superficiais não excessivamente altas (com poros suficientemente largos) para diminuição dos efeitos de adsorção sobre as moléculas do soluto, dos quais resultaria a operação simultânea de tipos diferentes de mecanismos cromatográficos (partição e adsorção) com a consequência do aparecimento de caudas nos picos e diminuição de reprodutibilidade.⁽²²⁾

4.2.2.7 Detectores

Os detectores são sensores com dispositivos electroquímicos, que detectam e enviam um sinal a um processador. Os detectores para HPLC devem ser caracterizados por dar uma resposta linear em função da concentração de soluto, numa grande gama de concentrações, e ter uma elevada relação sinal/ruído (atendendo a que o ruído é devido a flutuações ou perturbações na temperatura, pressão ou alterações do fluxo da fase móvel, podendo ser também devido ao circuito eléctrico do detector). Este ruído deve ser baixo para que baixas concentrações de soluto possam ser detectadas. ⁽²²⁾

Detectores selectivos, são por exemplo, detectores de ultravioleta/visível (UV/Vis), fluorescência e electroquímicos de feixe simples ou duplo e de comprimento de onda fixo (monocromático) ou variável. Os fundamentos destes detectores (excepto dos electroquímicos) baseiam-se na Lei de Lambert-Beer. A radiação emitida por uma fonte luminosa, (lâmpada de mercúrio de baixa pressão para a radiação monocromática de 254nm), atravessa outra célula de fluxo com a fase móvel a analisar e a radiação transmitida, actua numa foto-célula que gera uma corrente proporcional à intensidade da luz. Esta corrente, é subtraída à da foto-célula de referência e a resultante é amplificada e, transmitida ao registador. Podem também ser utilizados espectrofotómetros como detectores de HPLC, permitindo a associação de uma fonte de luz de espectro contínuo com um monocromador, uma ampla versatilidade na selecção dos comprimentos de onda que permite, assim, operar na máxima de adsorção do soluto em estudo. ⁽²²⁾

Detectores UV/Vis são os mais comuns dos detectores de HPLC e permitem a absorção de luz na região do UV (190-400nm) e na região do visível (400-750nm). Existem equipamentos, que apenas permitem a análise de um comprimento de onda e outros, que permitem a análise de comprimentos de onda variáveis ou sistema de rede de díodos (“*diode array*”). No caso da análise no UV são utilizadas lâmpadas de deutério ou de xenon a alta pressão, enquanto no visível a lâmpada utilizada é a de tungsténio. ⁽²²⁾

Os detectores de rede de díodos são bastante versáteis, permitindo a obtenção de um espectro entre os 190 e 750 nm, de forma a identificar e verificar a pureza de uma amostra por comparação do espectro com um espectro de uma solução de referência. Permite também quantificar vários picos a diferentes comprimentos de onda utilizando um só

cromatograma, ou obter gráficos 3D do pico eluído, entre outras funções. Contudo a sensibilidade destes detectores é mais reduzida que os anteriormente referidos.⁽²²⁾

Detectores de fluorescência são altamente sensíveis, contudo só podem ser utilizados para a análise de compostos com fluorescência própria ou que têm fluorescência quando reagem com um agente derivatizante. Sendo uma característica do soluto, este método é bastante selectivo e específico para um dado componente.⁽²²⁾

Detectores electroquímicos são também bastante sensíveis e específicos, mas necessitam que o soluto tenha um grupo funcional electro-oxidável ou redutível.⁽²²⁾

4.2.2.8 Processador de dados

O Processador de dados estabelece a conexão entre os vários componentes do HPLC com um computador que contenha um programa que permita programar todos os componentes de forma automática e sincronizada, mas também processar os dados adquiridos pelo detector e apresenta-los na forma de um cromatograma.

4.2.2.9 Reservatório de eluente

O reservatório consiste numa câmara onde fica armazenado o solvente. Este pode estar directamente ligado à própria bomba ou ser independente. É frequente haver uma desgaseificação do solvente por aquecimento (refluxo), vácuo, vibração ultra-sónica ou borbulhamento de hélio. A desgaseificação permite impedir a formação de pequenas bolhas gasosas no detector e a alteração da amostra ou até das fases móveis, por reacção com o oxigénio do ar; uma entrada de N₂ no reservatório permitirá manter o eluente sob a atmosfera deste gás inerte, podendo assim proceder-se à análise de amostras sensíveis ao ar.⁽²¹⁾

4.2.2.10 Fases móveis

A fase móvel é um líquido que está a ser continuamente bombeado para a coluna e que actua como transportador da amostra. É a interação química entre a fase móvel e amostra com o enchimento da coluna que determina o grau de migração e separação dos componentes contidos na amostra. É o tipo e a composição da fase móvel que influencia a separação numa dada coluna.

4.2.2.11 Fases estacionárias

A fase estacionária consiste em pequenas partículas porosas que aumentam a área superficial. Os principais parâmetros da fase estacionária são: o tamanho da partícula, a distribuição do tamanho da partícula, o tamanho do poro, área de superfície, tipo e quantidade de ligantes.

A natureza das fases estacionárias é um importante parâmetro para determinar as propriedades dos sistemas de separação de fase normal ou fase reversa. No caso da cromatografia de fase reversa, a sílica apresenta normalmente ligantes de cadeias carbonadas como por exemplo, C₈, C₁₈ ou fenil. Nas fases estacionárias utilizadas na cromatografia de fase normal, a sílica está ligada a cadeias com grupos de ciano, aminas, ou diois, de forma a adaptarem propriedades polares, Tabela 3.⁽²¹⁾

Tabela 3 - Tipos de ligantes das fases estacionárias.⁽²⁷⁾

Octil	=Si-[CH ₂] ₇ -CH ₃	C ₈
Octadecil	=Si-[CH ₂] ₁₇ -CH ₃	C ₁₈
Fenil	=Si-[CH ₂] _n -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
Cianopropil	=Si-[CH ₂] ₃ -CN	CN
Aminopropil	=Si-[CH ₂] ₃ -NH ₂	NH ₂
Diol	=Si-[CH ₂] ₃ -O-CH(OH)-CH ₂ -OH	

4.2.3 Mecanismos de retenção

Como já referido, o método de HPLC é um processo dinâmico dominado pelas interações competitivas entre as moléculas da amostra e as moléculas da fase móvel pelos locais de adsorção. As forças de adsorção podem ser relacionadas com os diferentes tipos de separação por HPLC, tais como, as interações hidrofóbicas características da separação por fase reversa, as interações dipolo-dipolo da separação da fase normal e interações iónicas da cromatografia de troca iónica.

4.2.4 Testes de conformidade do sistema

O processo de validação compreende não só a parte analítica mas tudo o que está relacionado com o método utilizado. Para tal, é necessário ter em conta o uso de equipamento e sistemas adequados, qualificados e validados.⁽⁵⁾

É necessário garantir que a avaliação efectuada a uma análise analítica é a mais correcta, e que não há interferências de reagentes ou compostos das formulações do medicamento a serem quantificados, como impurezas ou produtos relevantes à caracterização do composto a analisar. Por isso, é essencial a análise de ensaios de brancos, análises em duplicado, o uso de padrões de controlo, ou até análise de placebo em paralelo com as amostras, de forma a garantir uma boa avaliação.⁽⁵⁾

A utilização de ensaios de brancos deve ser utilizada com o objectivo de avaliar a incidência de contaminações provenientes dos reagentes e da atmosfera do laboratório (existência de vapores e poeiras) durante o processo de manipulação.

Os ensaios em duplicado consistem na preparação, independente, de dois ensaios da mesma amostra, permitindo fornecer informação adequada sobre a homogeneidade das amostras em estudo e sobre o processo de preparação destas.

Durante toda a análise são avaliados padrões de referência que permitem controlar a variabilidade da metodologia, obtendo informações sobre a resposta do equipamento e o comportamento das soluções ao longo do tempo. Estes padrões devem ser usados de forma idêntica às amostras, apresentar uma matriz semelhante a estas e estarem adequados às

gamas de trabalho. Um padrão de referência é um composto altamente purificado, totalmente caracterizado de forma a avaliar com segurança os resultados obtidos. ⁽²⁵⁾

Podem ser utilizados padrões de referência certificada, cujas propriedades já foram analisadas e são acompanhados de um certificado emitido por um organismo de certificação. Também podem ser usados padrões internos de referência, cujos valores de uma ou mais propriedades foram certificados por um processo tecnicamente válido. ⁽²⁶⁾

O placebo contém todos os ingredientes da formulação do medicamento, ou seja contém todos os excipientes utilizados menos o princípio activo.

Outro passo importante antes da validação de um método é a análise da conformidade do sistema (“*system suitability*”), de forma a garantir que a performance do sistema cromatográfico é adequada para a análise a realizar. Parâmetros como resolução, número de pratos teóricos, factor de simetria ou factor de arrastamento, factor de retenção, factor de capacidade, precisão/repetibilidade ou recuperação, permitem uma avaliação da conformidade do sistema quando comparados com as especificações do método. ⁽⁵⁾

4.2.4.1 Resolução

O parâmetro da resolução (R) é utilizado para avaliar a separação e relacionar algum tipo de interferência entre dois picos. São relacionadas as suas larguras a meia altura (W_1 e W_2) e os respectivos tempos de retenção (t_{R1} e t_{R2}), segundo a equação seguinte e é ilustrado na Figura 12:

$$R = 1,18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)}$$

É recomendado pela Farmacopeia Europeia um valor de $R > 2$, entre o pico de interesse e o pico com possível potencial de interferência (impureza, excipientes, produtos de degradação, padrão interno, etc.). ⁽²⁷⁾

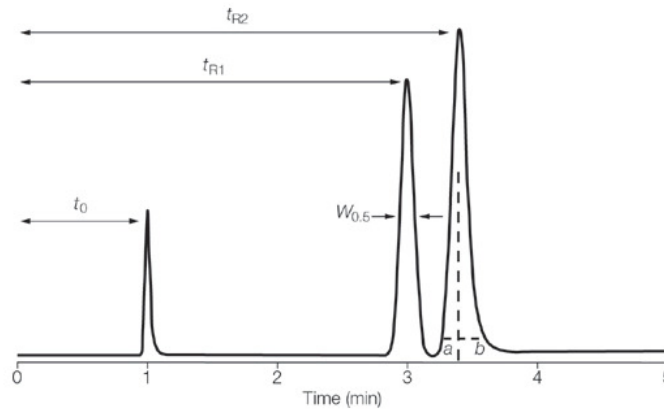


Figura 12 - Esquema de um cromatograma ilustrativo do cálculo da resolução, número de pratos teóricos, factor de simetria e factor de retenção. ⁽²⁸⁾

4.2.4.2 Número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos (N) avalia a eficiência da separação dos picos na coluna e é calculado segundo a seguinte equação, estando também ilustrado na Figura 12:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_{base}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

Onde t_R é o tempo de retenção do pico, w_{base} é a largura do pico na linha de base e $w_{0,5}$ é a largura do pico a meia altura. Também se pode relacionar o número de pratos teóricos com a altura de um prato teórico (H) e o comprimento da coluna (L), segundo a equação:

$$N = L / H$$

O número de pratos teóricos corresponde ao número de secções transversais imaginárias da coluna onde ocorrem equilíbrios separados por analito, ou seja, consiste no facto da separação ocorrer sob equilíbrios independentes entre o analito e a fase estacionária ao longo da coluna como se estas estivessem separadas fisicamente por secções.

Os factores que podem afectar o valor de N e/ou consequentemente H são o tamanho da partícula da coluna, o fluxo da fase móvel, a temperatura a que a coluna se encontra, a

viscosidade da fase móvel e o peso molecular do composto em análise. O número mínimo de pratos teóricos recomendados pela FDA é de 2000, salvo casos específicos que apresentam outro limite utilizado para a avaliação da conformidade do sistema. Quanto menor o número de pratos teóricos mais largo será o pico observado, ou seja, maior será a distribuição dos analitos na coluna e por essa razão uma resposta menos eficiente, como mostra a Figura 13.⁽²⁹⁾

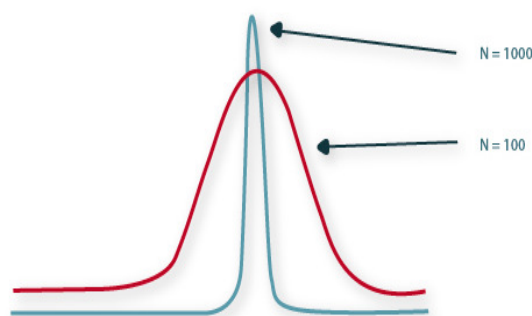


Figura 13 - Influência de N na resposta da coluna cromatográfica.⁽³⁾

4.2.4.3 Factor de simetria e o factor de arrastamento

Estes parâmetros avaliam a frente do pico e a forma como este termina (“cauda”). Permite identificar se o pico tem um formato gaussiano e avaliar a forma como este resultado pode influenciar o desempenho do método. Apesar de serem, por vezes identificados como o mesmo parâmetro, devido a permitirem a mesma avaliação do pico, o valor do factor de simetria e do “tailing factor” ou factor de arrastamento de um pico são ligeiramente diferentes, não podendo ser convertidos directamente.⁽³⁰⁾

Na maioria das análises cromatográficas, o factor de simetria é definido como a largura da frente do pico (*a*), sobre a largura da metade posterior do pico (*b*), considerando todas as medições feitas a uma altura de 10% (*W*_{0,10}) do pico, segundo a equação seguinte e a Figura 14:⁽³⁰⁾

$$T = a / b$$

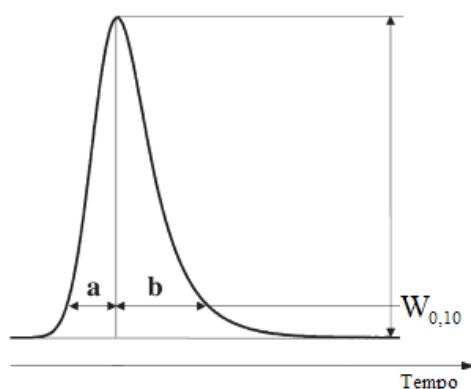


Figura 14 - Esquema de um cromatograma ilustrativo para o cálculo do factor de simetria. ⁽³¹⁾

Na indústria farmacêutica, é mais comum utilizar-se o cálculo do factor de arrastamento, que é definido como a largura do pico a uma altura de 5% ($W_{0,05}$) dividida por duas vezes a distância da linha central ao início do pico (f), também medida a uma altura de 5 %, como é ilustrado na Figura 15. ⁽²⁷⁾ Neste caso, utiliza-se a equação seguinte que é a sugerida pelas farmacopeias (europeia e americana):

$$T = W_{0,05} / 2f$$

Será portanto, esta a designação utilizada no presente trabalho, sempre que se estiver a analisar a simetria do pico cromatográfico, ou seja, a avaliar a relação entre a sua frente e a sua “cauda”.

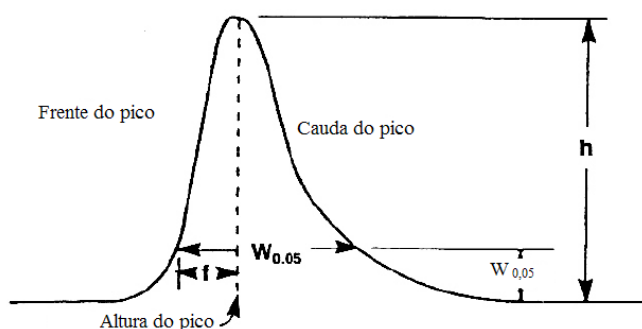


Figura 15 - Esquema de um cromatograma ilustrativo para o cálculo do factor de arrastamento. ⁽²⁷⁾

É recomendado, segundo a Farmacopeia Europeia, um valor de T inferior a 2. A dificuldade em determinar o final do pico, devido ao aumento do arrastamento, leva à diminuição do desempenho do método, como se pode observar na Figura 16.

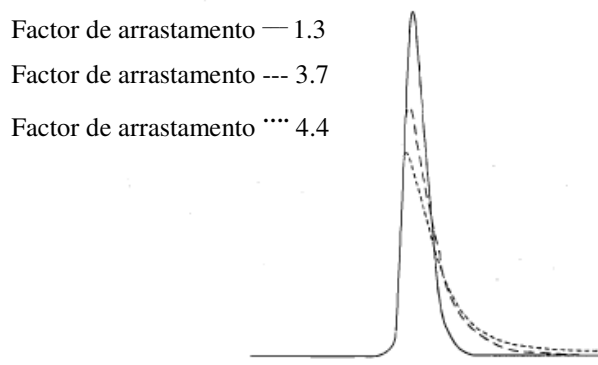


Figura 16 - Esquema de um pico de HPLC com vários factores de simetria. ⁽³¹⁾

4.2.4.4 Factor de retenção

O factor de retenção (α) é medido pelo tempo de retenção relativo de dois picos (t_{R1} e t_{R2}) em relação ao tempo morto (t_0), segundo a equação seguinte e com base na Figura 12.

$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_0)}{(t_{R1} - t_0)}$$

O tempo morto, t_0 , é o tempo necessário para que um composto percorra toda a coluna, sem que sofra retardamento por parte da fase estacionária. O tempo morto é normalmente identificado pela primeira alteração da linha de base no cromatograma, também designada por frente de solvente.

4.2.4.5 Factor de capacidade

O factor de capacidade (K') é uma medida de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, ou seja mede o tempo em que um analito é retido pelas partículas da coluna em relação ao tempo percorrido na fase estacionária, segundo a equação:

$$K' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

sendo o t_R e o t_0 , o tempo de retenção e o tempo morto, respectivamente.

Este valor é específico para cada substância dependendo das fases móvel e estacionária, da temperatura e da qualidade de enchimento da coluna. Quanto maior for este valor melhor será a retenção ao soluto. Idealmente seria todos os picos iluirem com um valor de K' entre o 2 e o 10, de forma a obter uma melhor performance cromatográfica. Contudo, para as amostras mais complexas podem ser aceites valores entre o 1 e o 20. Quando K' é inferior a 2, pode não haver uma total separação entre os picos e a frente de solvente, estando mais sensível a pequenas variações na composição da fase móvel. A FDA recomenda que o factor de capacidade deve ser superior a 2.

4.2.4.6 Precisão/Repetibilidade

O cálculo da precisão de um método é efectuado a partir de uma série de análises consecutivas do mesmo padrão. Esta avaliação é feita segundo o desvio padrão relativo (RSD) das áreas obtidas e permite avaliar o desempenho cromatográfico de uma análise de HPLC.

$$RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

Uma grande variação entre as áreas dos picos relativos a cada análise poderá estar relacionada com um funcionamento deficiente das bombas do equipamento, da coluna ou das condições ambientais afectando também o tempo de retenção da amostra.

4.2.4.7 Exactidão do método

A exactidão de um método analítico, geralmente expressa em percentagem, é definida como a resposta do detector a uma concentração de um analito adicionado na

amostra, em comparação com a resposta do detector obtida para a concentração real de um padrão de referência. ⁽²²⁾

Segundo a conferência internacional de harmonização e de acordo com a farmacopeia europeia, a recuperação deve ser feita a partir de pelo menos três determinações, cada uma de 3 concentrações diferentes (por exemplo a 80, 100 e a 120% da concentração da amostra). A recuperação do analito não precisa ser 100%, contudo a extensão da recuperação obtida deve ser consistente, precisa e reprodutível. ⁽²⁾

CAPÍTULO 5 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Na indústria farmacêutica, a qualidade analítica é um factor importante nos diferentes processos de desenvolvimento, produção e controlo de qualidade de medicamentos. Os resultados analíticos permitem um acompanhamento da síntese de uma nova molécula, suportam os estudos de novas formulações, estabelecem os prazos de validade apoiados nos estudos de estabilidade, e têm ainda a importante missão de avaliar a conformidade dos materiais com as especificações de qualidade instituídas. Esta avaliação confere robustez e qualidade aos métodos analíticos, permitindo conhecer e estabelecer o desempenho global de um procedimento analítico. ⁽¹⁹⁾

A validação é definida como o processo de demonstrar que os resultados obtidos numa medida analítica são adequados para o fim a que se destinam. Segundo Bressole e seus colaboradores, um processo de validação bem definido e documentado, oferece às entidades reguladoras evidências objectivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. ⁽³²⁾

Segundo a norma internacional referente à validação de métodos analíticos, a validação é a “confirmação por testes e apresentação de evidências objectivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional”. ⁽⁶⁾

Na indústria farmacêutica, o processo de validação aplica-se a todos os procedimentos analíticos envolvidos no desenvolvimento, produção e controlo de medicamentos. Os métodos utilizados na análise dos materiais, desde as matérias-primas, produtos intermediários, excipientes, substâncias activas, até aos produtos acabados, devem ser validados. Os procedimentos utilizados para avaliar os produtos farmacêuticos asseguram a sua identidade, potência (teor) e pureza, e têm de satisfazer determinados requisitos impostos legalmente. ⁽¹⁹⁾

Para cada um destes procedimentos analíticos pode ser utilizada uma grande variedade de técnicas e tecnologias analíticas, e é lógico que as exigências de desempenho dependem da aplicação pretendida. Significa que um procedimento analítico deve ser validado individualmente e orientado para a aplicação pretendida. ⁽¹⁹⁾

Os conceitos e estratégias que definem o processo de validação encontram-se descritos em artigos, protocolos e relatórios publicados por utilizadores de métodos analíticos, pelas comissões industriais e pelas autoridades reguladoras. Contudo, o consenso mundial na validação de métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica surgiu definitivamente após a publicação das directrizes da ICH. ⁽³³⁾

O produto analisado pertence ao grupo das estatinas e devem ser validados todos os métodos de identificação e quantificação que o permitem caracterizar. Neste sentido, são designados por métodos de conteúdo os processos que permitem identificar e quantificar um dado composto existente no produto final, seja ele um excipiente, qualquer tipo de impurezas ou o próprio composto activo.

5.2 TIPO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS A VALIDAR

As matérias-primas utilizadas na produção de um medicamento têm de satisfazer uma série de requisitos impostos pelas especificações legais de qualidade, quer se trate das substâncias activas, dos excipientes, ou de quaisquer outros materiais. ⁽³⁾

O objectivo do método analítico deve ser claramente entendido e deve conter todos os parâmetros necessários a serem avaliados numa validação. Os parâmetros avaliados numa validação e que serão de seguida desenvolvidos são: precisão, exactidão, repetibilidade, precisão intermédia, especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade e gama de trabalho. ⁽³⁾

Na Tabela 4, são apresentados os parâmetros mais importantes e que devem ser analisados num processo de validação analítico ou, num processo de revalidação em casos de alteração nos processos de produção ou em mudanças de procedimento analítico. ⁽³⁾

Esta lista deverá ser considerada típica para os procedimentos analíticos citados, mas salvo raras excepções pode ser alterada. A robustez, apesar de não estar integrada na tabela, deve ser avaliada em alguns casos durante o desenvolvimento do método analítico.

Tabela 4 - Parâmetros analisados para os métodos de validação de identificação, teste de impurezas e conteúdo.⁽³⁾

Procedimento analítico	Identificação	Teste impurezas		Conteúdos
		Quantitativo	Limite	
Exactidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermédia	-	+ ⁽¹⁾	-	+ ⁽¹⁾
Especificidade ⁽²⁾	+	+	+	+
Limite de detecção	-	- ⁽³⁾	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

- Significa que esta característica não é normalmente avaliada

+ Significa que esta característica é normalmente avaliada

(1) nos casos em que a reprodutibilidade foi realizada, a precisão intermédia, não é necessária

(2) a falta de especificidade de um procedimento analítico poderia ser compensada através de um outro procedimento analítico de apoio

(3) pode ser necessária em alguns casos

5.3 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO

Na indústria farmacêutica, os métodos de validação já estão bastante documentados, devendo-se seguir as recomendações em vigor das agências governamentais, como por exemplo, as da FDA, da Farmacopeia Europeia ou de outros guias de aprovação recomendados. De seguida serão descritos os vários parâmetros que podem ser avaliados numa validação de um método.

5.3.1 Especificidade ou selectividade

A especificidade do método (ou também designada selectividade) é a capacidade de avaliar inequivocamente um analito presente na amostra. A especificidade é avaliada comparando a resposta do método numa solução contendo apenas o analito com a resposta obtida em soluções contendo o analito juntamente com os outros componentes da amostra (placebo, intermediários de síntese, produtos de degradação, impurezas de processo).⁽³⁾

5.3.1.1 Identificação

As análises qualitativas utilizadas para os testes de identificação devem ser capazes de garantir a distinção e identificação de um determinado composto existente numa amostra simples como uma matéria-prima até a uma amostra com vários compostos como é o exemplo de uma forma farmacêutica. Esta identificação é feita qualitativamente pela comparação de uma propriedade da amostra (ponto ou intervalo de fusão, índice de refração, solubilidade em água, solventes orgânicos, massa específica ou rotação óptica) com um material de referência conhecido ou, em amostras contendo a substância ou que esteja intimamente relacionada com ela, sendo este último caso sujeito a um julgamento científico sólido.⁽³⁾

5.3.1.2 Teste de conteúdo e impurezas

Os procedimentos para a análise de conteúdo são destinados a medir o analito presente numa determinada amostra. Este teste representa uma medida quantitativa do componente principal, o princípio activo, ou outros componentes seleccionados, como por exemplo conservantes. Devem ser utilizados cromatogramas representativos, de forma a demonstrar a especificidade para o composto principal ou de impurezas conhecidas, estando os restantes componentes devidamente identificados.⁽³⁾

O teste de impurezas pode ser um teste quantitativo ou um ensaio-limite para a impureza na amostra, havendo diferentes parâmetros de validação a analisar para cada um destes testes. ⁽³⁾

Para o teste de impurezas disponíveis, a selectividade pode ser estabelecida por fortificação do fármaco com níveis adequados de impurezas, de forma a demonstrar a sua separação individual de outros componentes na matriz da amostra. ⁽³⁾

Se as impurezas ou outros produtos de degradação não estiverem disponíveis, a especificidade pode ser demonstrada pela comparação dos resultados das análises das amostras realizados segundo um outro procedimento, por exemplo o método da farmacopeia ou outro procedimento de análise validado. ⁽³⁾

5.3.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método, em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma determinada gama de aplicação. ⁽³⁴⁾

Geralmente, a linearidade é avaliada graficamente, através do traçado de curvas de calibração com um mínimo de cinco pontos, sendo utilizado o valor do coeficiente de correlação (r), para avaliar o grau de linearidade dos pontos experimentais, que deve ser próximo de 0,999, de forma a garantir o ajuste dos dados. ⁽²⁾

Contudo, também deve ser calculada matematicamente, por uma análise de variância à recta de regressão. Outros parâmetros como o declive e a intercepção da recta no eixo dos y devem ser também avaliados, sendo recomendado uma intercepção próxima de zero. ⁽³⁵⁾

5.3.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho é normalmente proveniente dos estudos de linearidade e depende da aplicação pretendida no procedimento. A gama analítica é o intervalo entre as

concentrações máximas e mínimas do analito que se podem quantificar com um nível adequado de precisão, exactidão e linearidade. ^(19,34)

5.3.4 Exactidão

A exactidão de um método é uma medida do erro sistemático ou viés, e é definida como a relação entre o valor medido e o valor verdadeiro. A exactidão de um método, ou de um resultado, está condicionada pela existência de erros sistemáticos, que se manifestam sempre da mesma maneira, para um dado conjunto de ensaios independentes. ⁽²⁵⁾

Os erros sistemáticos põem em causa a veracidade do resultado experimental, provocando o seu afastamento relativamente ao verdadeiro valor presente na amostra analisada. Este tipo de erros pode ser classificado em três categorias: erros instrumentais, onde são incluídas a má calibração do material e as avarias parciais do equipamento; erros operativos, onde são incluídos alguns erros dos analistas e erros de método, associados a interferências de vária ordem e à existência de reacções secundárias no método analítico. ⁽²⁵⁾

A exactidão deve ser expressa em percentagem segundo a equação seguinte:

$$Exactidão = \frac{\text{Valor medido}}{\text{Valor verdadeiro}} \times 100$$

Segundo a ICH Q2, a metodologia recomendada para a análise da exactidão consiste na realização no mínimo de três determinações em cada uma de três concentrações diferentes, abrangendo toda a gama especificada, sendo recomendado incluir uma concentração perto do limite de quantificação, outro a meio da gama e um terceiro mais elevado (habitualmente considera-se o intervalo 80-120% em relação ao valor esperado). ⁽³⁾

A exactidão, deve ser apresentada como a percentagem de recuperação, quando é conhecida a concentração do analito na amostra, ou como diferença entre a média e o valor verdadeiro, e em ambos os casos em conjunto com os intervalos de confiança. A

recuperação é então definida como a quantidade de substância de interesse na amostra (presente ou adicionada), que é extraída e passível de ser quantificada.^(3, 36)

5.3.4.1 Conteúdo

A exactidão, num ensaio de conteúdo, pode ser obtida por aplicação de um procedimento analítico de uma substância pura conhecida (por exemplo, material de referência), por comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado ou pode ser inferida, quando determinadas a precisão, a linearidade e a especificidade.⁽³⁾

5.3.4.2 Impurezas (Quantificação)

Para a quantificação das impurezas, estas devem ser fortificadas na amostra com quantidades conhecidas. Quando não é possível obter-se as impurezas, é justificável utilizar-se um resultado obtido por um outro procedimento independente como por exemplo por degradação forçada. De qualquer forma, deve ficar claro como as impurezas individuais ou totais são determinadas, por exemplo, pela relação peso/peso ou por percentagem de área.⁽³⁾

5.3.5 Precisão

A precisão de um método analítico, é uma medida do erro aleatório e corresponde à concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo método de ensaio, várias vezes e em condições bem definidas. Estes erros ocorrem de acordo com as leis do acaso e são responsáveis pelo aparecimento de uma dispersão de resultados entre ensaios independentes em torno do valor médio respectivo.⁽³⁾

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições. Na prática, em validação de métodos, o número de

determinações é geralmente pequeno (no mínimo de três concentrações diferentes dentro da gama analítica) e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s). Para além do desvio padrão absoluto, também o desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (cv) e o intervalo de confiança devem ser relatados para o cálculo da precisão. ⁽³⁾

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad RSD \text{ ou } cv = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

onde \bar{x} é a média aritmética das determinações, x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições. ⁽³⁾

O intervalo de confiança, é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, e é calculado pela equação:

$$\text{Intervalo confiança} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

em que t_{n-1} é valor crítico da distribuição de *t*-student com n-1 graus de liberdade. O valor *t* é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança. ⁽³⁾

A precisão é expressa pelo desvio do padrão relativo de várias repetições e pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. ⁽³⁷⁾

5.3.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade consiste em analisar o grau de variabilidade dos valores obtidos para a mesma amostra, repetindo a mesma metodologia com o mesmo analista, o mesmo equipamento e os mesmos reagentes num curto espaço de tempo, por exemplo num dia. A repetibilidade permite também avaliar, entre outros, o desempenho do instrumento de cromatografia de HPLC. ⁽³⁸⁾

Este ensaio pode ser avaliado usando no mínimo nove determinações, abrangendo a gama de trabalho ou no mínimo seis determinações de uma concentração teste a 100%.⁽³⁾

5.3.5.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia permite avaliar a relação de variações típicas num laboratório ou no procedimento analítico, tais como a análise em diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos podendo estes efeitos ser combinados ou não. O objectivo da validação da precisão intermédia é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados independentemente de algumas alterações que possam ocorrer. Este parâmetro permite ter uma noção do comportamento de robustez do método.^(3, 36, 38)

5.3.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é a capacidade de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efectuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.) de forma a estimar a precisão do método intra-ensaio e inter-ensaio. Esta abordagem permite uma análise dos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios, e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias. As variáveis que afectam a reprodutibilidade de um método analítico incluem: temperatura e humidade, equipamentos, solventes, reagentes, materiais e experiência dos operadores.⁽³⁾

A reprodutibilidade de um método será tanto melhor quanto menor for o valor do desvio padrão relativo, uma vez que a dispersão dos resultados em torno do valor médio é mais reduzida.^(3, 36, 38)

A diferença entre precisão intermédia e reprodutibilidade baseia-se apenas na resposta dos ensaios intra-laboratorial e inter-laboratorial, respectivamente. As alterações testadas podem ser as mesmas, contudo na reprodutibilidade o principal objectivo é a relação dos resultados obtidos entre diferentes laboratórios, atendendo às possíveis alterações de condições físicas que possam ocorrer.

5.3.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) num procedimento analítico é a quantidade mínima de um composto na amostra que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada com valor exacto. ^(32, 38)

O limite de quantificação (LQ) é a concentração de analito mais baixa que é possível quantificar com precisão e exactidão. ^(34, 35)

A estimativa destes parâmetros é ainda objecto de discussão. Existem vários tipos de modelos possíveis de ser usados na determinação destes limites: através de uma análise visual, de uma avaliação da razão sinal/ruído e, no desvio padrão e declive de uma curva de calibração. ⁽³⁹⁾

5.3.6.1 Baseados numa avaliação visual

Os limites de detecção são determinados pela análise de várias amostras com concentrações conhecidas de analitos, de forma a estabelecer os níveis mínimos em que este pode ser detectado com fiabilidade. ⁽³⁾

No caso de uma análise por HPLC, devem ser feitas comparações entre as áreas obtidas com as amostras de diferentes concentrações, e verificar qual a concentração mínima que o equipamento consegue detectar.

No caso do limite de quantificação o procedimento efectuado é semelhante ao do limite de detecção, contudo deve haver uma comparação das áreas obtidas pelo sinal do analito, de várias amostras com a mesma concentração, de forma a estabelecer os níveis mínimos em que o analito pode ser quantificado com exactidão e precisão. ⁽³⁾

5.3.6.2 Baseados na razão sinal/ruído

Esta abordagem apenas pode ser aplicada aos procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base. A determinação dos limites de detecção e quantificação pela razão sinal/ruído (S/R) é obtida segundo a seguinte equação:

$$S / R = \frac{2H}{h}$$

onde H é a altura do pico medido a partir do máximo do pico à linha de base, observada ao longo de uma extensão correspondente a 20 vezes a largura do pico a meia altura e, h é a altura do ruído de fundo também avaliado nesta extensão como representado na Figura 17.

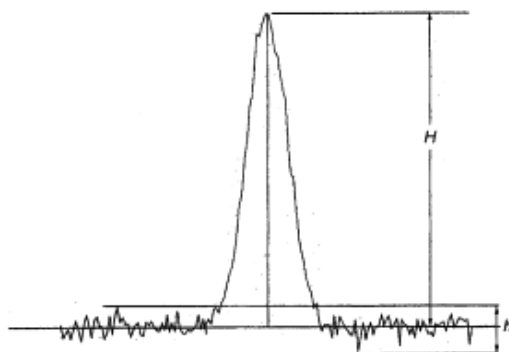


Figura 17 - Representação gráfica da determinação da razão sinal/ruído. ⁽²⁷⁾

A determinação da relação sinal/ruído é realizada comparando-se os sinais a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e determinada a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado ou quantificado com fiabilidade, consoante os casos. Segundo a ICH, os resultados da razão S/R para o limite de detecção de 3 ou uma relação 2:1 é geralmente aceitável enquanto que para o limite de quantificação a razão sinal/ruído já terá de ser de 10 ou uma relação de 10/1. ^(2,3,22)

5.3.6.3 Baseados no desvio padrão de resposta e no declive

Segundo a FDA e a Farmacopeia Europeia, os limites de detecção e quantificação podem ser determinados segundo o desvio padrão (*s*) e o declive (*b*), de acordo com as respectivas equações:

$$LD = \frac{3,3s}{b}$$

$$LQ = \frac{10s}{b}$$

Onde $s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$ corresponde ao desvio padrão das respostas e b ao declive

da curva de calibração. A estimativa de s pode ser obtida pelo cálculo do desvio padrão das respostas em amostras de brancos ou pelos valores da intercepção da recta no eixo dos y de várias rectas de calibração. ⁽³⁾

Quando os valores dos limites são obtidos através de extrapolações, devem ser posteriormente validados pela análise de amostras independentes que comprovam o resultado obtido por cálculo. ⁽³⁾

5.3.7 Robustez

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de procedimento em estudo. Deve mostrar a confiabilidade de uma análise com relação a deliberadas variações dos parâmetros do método. ⁽³⁾

A robustez do método consiste na avaliação das consequências, quando são aplicadas pequenas variações como o analista, troca de equipamento ou materiais (por exemplo marca de reagentes). Os parâmetros que podem influenciar os resultados e que são normalmente incluídos no estudo da robustez são: os analistas, os instrumentos, os lotes e fornecedores de reagentes, os tempos de extracção ou de mistura e, no caso particular das técnicas cromatográficas, devem ainda ser considerados a composição e pH da fase móvel, temperatura das colunas, volume de injeção, fluxo, lotes e fornecedores de colunas. ⁽³⁵⁾

Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando a percentagem de um dos componentes na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$. Se estas mudanças não alterarem os limites de exatidão, precisão e selectividade, então o método possui robustez, ou seja o método permite que pequenas variações como as exemplificadas acima não originem resultados muito diferentes. ⁽³⁶⁾

5.3.7.1 Estabilidade das soluções

A estabilidade avalia a capacidade das soluções amostra e padrão não serem alteradas devido a pequenas alterações das condições laboratoriais, como por exemplo, temperatura, humidade e luz, sofrendo degradação por hidrólise ou fotólise. O estudo da estabilidade permite estabelecer um período de tempo e de condições de armazenamento que garantem que as soluções utilizadas não tenham sofrido alterações ou degradações nas suas características originais.⁽³⁵⁾

A estabilidade das soluções amostra, deve ser comparada com a das soluções padrão que, por sua vez, devem ter um tempo de estabilidade definido de forma a abranger todo o tempo de utilização e preparadas segundo as mesmas condições de luminosidade e temperatura.⁽³⁵⁾

Na validação de um método analítico é necessário avaliar-se a estabilidade da amostra, bem como de todos os seus analitos ao longo da fase de desenvolvimento.^(35,38)

CAPÍTULO 6 – PROCEDIMENTO ANALÍTICO

6.1 CALIBRAÇÃO E PADRÕES DE REFERÊNCIA

A calibração permite garantir que os valores apresentados por um instrumento ou um sistema de medição estão relacionados com os valores representados por uma medida de referência (por exemplo um padrão de referência).

A calibração é o procedimento que relaciona a medição do sinal instrumental com a concentração do analito de interesse. O sinal instrumental é obtido para um determinado número de amostras em que a concentração do analito é conhecida (padrões de referência) e um modelo matemático relaciona a quantidade física medida com a correspondente quantidade química.

Os padrões de referência são utilizados para identificação, controlo de impurezas e doseamento das substâncias de uso farmacêutico. São considerados padrões de referência todos os materiais ou substâncias cujos valores de uma ou várias propriedades são suficientemente homogêneos para permitir a sua utilização na calibração de um aparelho ou na avaliação de um método de medida. Estes são caracterizados por uma variedade de técnicas analíticas escolhidas para demonstrar a sua aptidão para utilização.⁽¹⁸⁾

Podem também ser utilizados padrões de referência certificada, ou seja, materiais de referência acompanhados de um certificado que estabelece o ajustamento exacto da unidade em que os valores da propriedade são expressos e para a qual cada valor certificado é acompanhado de uma incerteza num nível de confiança indicado. São exemplos os padrões de referência da Farmacopeia Europeia com um teor determinado e destinado ao doseamento de uma substância para uso farmacêutico.⁽¹⁸⁾

De forma a reduzir a utilização de padrões de referência certificados, bastante avaliados e caracterizados, que podem estar disponíveis apenas em quantidades limitadas, podem ser utilizados padrões internos em ensaios de rotina no controlo da qualidade. Os padrões internos são caracterizados, no laboratório, em relação ao respectivo padrão de referência, segundo um procedimento específico para a atribuição do seu teor.⁽¹⁸⁾

Para além dos padrões devem ser analisados brancos que permitem avaliar também a conformidade da coluna e do sistema, através da análise da linha de base, do ruído existente e da identificação dos sinais provenientes dos solventes.

Uma vez provada a conformidade da calibração, então a análise pode ser sucessiva onde o sinal instrumental da amostra de concentração desconhecida é obtido e, através do modelo matemático definido na fase de calibração, é calculada a correspondente quantidade química.

De forma a controlar a conformidade do sistema ao longo da análise deve ser analisada uma solução padrão como controlo a cada seis análises de amostras consecutivas. É calculada a recuperação desta solução controlo em relação aos padrões da calibração e, caso se obtenham valores dentro dos limites de especificação então pode-se concluir a análise, caso contrário, não se consegue provar que o sistema está a comportar-se de maneira eficiente e portanto a análise não pode ser considerada.

6.2 PROCEDIMENTO E CÁLCULOS MATEMÁTICOS

Neste trabalho e durante as análises de rotina feito pelo controlo de qualidade, a calibração baseiou-se na avaliação feita com duas soluções padrão de forma a verificar se o equipamento se encontra em conformidade para a análise. Esta calibração consistiu em injectar 5 vezes a solução padrão 1 e uma vez a solução padrão 2. A sequência utilizada nas análises apresentou a seguinte estrutura:

- Injecção do branco (2 injecções ou até obtenção de uma linha de base estável)
- Injecção do padrão 1 (5 injecções consecutivas)
- Injecção do padrão 2 (1 injecção)
- Injecção de soluções amostras (máximo de 6 injecções)
- Injecção do padrão 1 ou 2 (solução controlo) (1 injecção)

Foi necessário calcular do factor de resposta (RF) das injecções das soluções padrão, segundo a equação:

$$RF = \frac{\text{Área do pico}}{\text{Concentração real}}$$

O cálculo da concentração real deve ter em conta as diluições feitas bem como a percentagem de conteúdo real do padrão, e neste sentido foi utilizada a seguinte equação:

$$C_p = \frac{\text{Peso } P \times \text{Conteúdo}(\%) \times \text{diluição}}{\text{Volume inicial} \times 100\%}$$

sendo: C_p = Concentração real da solução padrão (mg/ml)

Peso P = Peso do padrão (mg)

Conteúdo = Conteúdo do padrão de trabalho (%)

A conformidade do sistema foi avaliada através do desvio padrão relativo dos cinco factores de resposta com o auxílio da equação seguinte. O valor do RSD deve ser inferior ao limite estabelecido pela especificação, ou seja, menor ou igual a 2% para a análise do conteúdo e 5% para a análise das impurezas.

$$RSD(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão dos } RF's}{\text{Média dos } RF's} \times 100$$

Outro factor que também deve obedecer aos limites de especificação é a percentagem de recuperação (R) das duas soluções padrões determinado através da seguinte relação:

$$\text{Recuperação } (\%) = \frac{\overline{RF}_{STD\#1}}{RF_{STD\#2}} \times 100$$

Segundo a Farmacopeia Europeia o valor da recuperação nas análises do conteúdo deve estar entre $98\% \leq R \leq 102\%$ e para as impurezas entre $95\% \leq R \leq 105\%$.

A performance do sistema cromatográfico é controlada ao longo da sequência de análise através da injeção de solução padrão após cada seis amostras consecutivas analisadas, e calculada segundo a equação:

$$\text{Recuperação } (\%) = \frac{RF_{\text{controlo}}}{MRF} \times 100$$

Onde RF_{controlo} é o factor de resposta da injeção da solução controlo e MRF é a média do factor de resposta obtido pelas injeções da calibração segundo a equação:

$$MRF = \frac{RF_{\text{padrão } 1} + RF_{\text{padrão } 2}}{2}$$

Os limites da especificação para a solução de controlo para o caso da análise do conteúdo estariam entre os 97% e os 103%, enquanto para o caso da análise das impurezas este limite seria mais alargado, ou seja 90% e 110%.

O cálculo utilizado para o conteúdo das soluções amostra, tanto para a exactidão no método de quantificação do composto Y como para a verificação da exactidão do limite de quantificação utilizado no método de quantificação das impurezas do composto X foi o seguinte:

$$Exactidão = \frac{\text{Área} \times \text{Volume} \times \text{Área Média} \times \text{Factor de conversão}}{MRF \times \text{Peso} \times \text{Diluição}} \times 100$$

Atendendo que o MRF é a média dos factores de resposta obtidos pelos padrões da calibração.

CAPÍTULO 7 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Tanto o procedimento para a análise das substâncias relacionadas com o composto X como para a quantificação do conservante Y, foram fornecidos pelo cliente da Bluepharma os quais deveriam ser validados de forma a serem utilizados posteriormente em ensaios de rotina pelo controlo de qualidade.

7.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

7.1.1 Reagentes

- Água, qualidade para HPLC
- Acetonitrilo isocrático (Prolabo)
- Acetonitrilo gradiente (Merck)
- Ácido forfórico R - Ácido ortofosfórico 85% (Merck)
- Solução de Ácido fosfórico 25% (Merck)

7.1.2 Equipamentos

- Balança analítica, resolução 0,1mg (Mettler – Toledo)
- HPLC, com auto-injector, forno refrigerado, detector UV (LC-2010C HT, Shimadzu)
- HPLC, com auto-injector, forno refrigerado, detector UV (LC2010C HT, Waters Alliance)
- Banho ultra-sons (Sonorex)
- Coluna cromatográfica Hypersil BDS 120A C18 (5µm, 250x4,6mm)
- Coluna cromatográfica Gemini 110A C18 (3µm, 50x4,5mm)

7.1.3 Padrões

- Placebo Mistura de excipientes) do composto X
- Padrão de referência do composto conservante Y
- Padrão de referência do composto X
- Padrão de referência da impureza A
- Padrão de referência da impureza B
- Padrão de referência da impureza C
- Padrão de referência da impureza D
- Padrão de referência da impureza E

7.1.4 Material auxiliar

- Material de pesagem – espátulas e “barcos de pesagem”
- Balões volumétricos de 20 e 100 ml
- Pipetas volumétricas de 2 ml
- Frascos (Vials) e septos para HPLC (~1.5 ml)
- Filtros com membrana de 0.45 μm (GHP Pall, PVDF Millipore e Nylon WMR)
- Luvas
- Máscara de pó
- Máscara de gases

7.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

7.2.1 Preparação das soluções para a validação do método de conteúdo do composto Y

Preparação da fase móvel/solvente

Preparou-se uma mistura de Acetonitrilo: Água purificada: solução de ácido fosfórico (25%) nas proporções 600:400:1 (v/v).

Solução do branco

Encheu-se um vial de HPLC com a solução solvente (fase móvel) e tapou-se imediatamente para analisar.

Solução contendo Composto Y a uma concentração de 0,0038 mg/ml (3,8 µg/ml), preparado segundo uma amostra para estudo da filtração (contudo, sem outros componentes da formulação)

Pesou-se cerca de 19,2 mg do composto Y para um balão volumétrico limpo e seco de 100 ml, adicionou-se cerca de 70 ml de solvente e levou-se ao ultrassons até dissolver. Perfez-se o volume do balão com solvente. Diluiu-se 2 ml da solução anterior ($C=0,0019$ mg/ml) para um balão volumétrico limpo e seco de 100 ml, adicionou-se 5ml de água ultrapura e perfez-se o balão com solvente.

Solução padrão do composto Y a uma concentração 0,1 mg/ml

Pesou-se cerca de 20 mg do composto Y para um balão volumétrico limpo e seco de 200 ml, adicionou-se cerca de 150 ml de solvente e levou-se ao ultrassons até dissolver. Perfez-se o volume do balão com solvente.

Solução padrão do composto Y a uma concentração 0,004 mg/ml para o estudo da precisão do sistema do padrão, exactidão linearidade e estabilidade do padrão

Diluiu-se 2 ml da solução anterior ($C=0,1$ mg/ml) para um balão volumétrico de 50 ml e perfez-se o volume com o mesmo solvente.

As soluções utilizadas para a precisão o sistema do padrão foram preparadas com todos os pesos independentes, tendo-se obtido em cada solução padrão de concentração de $4,018 \times 10^{-3}$ mg/mL, $4,360 \times 10^{-3}$ mg/mL, $4,100 \times 10^{-3}$ mg/mL.

As soluções das estabilidades foram preparadas a partir das soluções stock, tendo-se obtido uma concentração respectivamente de: $4,04 \times 10^{-3}$ mg/mL, $4,07 \times 10^{-3}$ mg/mL e $3,83 \times 10^{-3}$ mg/mL.

Para o estudo da linearidade foram preparadas soluções por diluição das soluções stock de forma a obter as seguintes concentrações: $2,444 \times 10^{-3}$ mg/mL, $3,259 \times 10^{-3}$ mg/mL, $4,018 \times 10^{-3}$ mg/mL, $4,822 \times 10^{-3}$ mg/mL, $5,625 \times 10^{-3}$ mg/mL do composto Y.

Solução do composto Y a uma concentração 0,0019 mg/ml (1,9 µg/ml)

Pesou-se cerca de 19,2 mg do composto Y para um balão volumétrico limpo e seco de 100 ml, adicionou-se cerca de 70 ml de solvente e levou-se ao ultrassons até dissolver. Perfez-se o volume do balão com solvente. Foram preparadas duas soluções stock diferentes e avaliado o desvio padrão entre os factores de resposta dos dois padrões. Os padrões são considerados válidos se apresentarem um desvio inferior a 2 %.

Solução do composto Y a uma concentração 0,0038 mg/ml (3,8 µg/ml)

Diluiu-se 2 ml da solução anterior ($C=0,0019$ mg/ml) para um balão volumétrico limpo e seco de 100 ml e perfez-se o balão com o mesmo solvente.

Solução padrão do composto X a uma concentração 2 mg/ml

Dissolveu-se cerca de 20 mg do composto X para um balão volumétrico limpo e seco de 10 ml, com solvente e perfez-se o volume do balão com solvente.

Solução da fórmula reconstituída (Composto X+composto Y+excipientes) depois de filtrado ($C_{\text{Composto X}}= 2$ mg/mL; $C_{\text{Composto Y}}= 0,0038$ mg/mL) para estudo da estabilidade das amostras, exactidão, precisão do método e precisão do sistema

Pesou-se cerca de 20 mg do composto X e 185 mg de placebo para um balão volumétrico limpo e seco de 10 ml. Adicionou-se 200 µl da solução do composto Y com uma concentração 0,19 mg/ml e dissolveu-se no ultrassons. Perfez-se o volume do balão com solvente e filtrou-se a solução com o sistema de filtração adequado.

Foram preparadas três soluções para o estudo da exactidão a 60%, 100% e 140%. Para a precisão do sistema das amostras foram preparadas 3 soluções amostra independentes de concentrações 3.82×10^{-3} mg/mL, 3.82×10^{-3} mg/mL e 3.83×10^{-3} mg/mL.

Solução contendo Composto Y e excipientes depois de filtrado ($C_{\text{Composto Y}} = 0,0038$ mg/mL)

Pesou-se cerca de 20 mg do composto X e 185 mg de placebo para um balão volumétrico limpo e seco de 10 ml. Adicionou-se 200 µl da solução do composto Y com uma concentração 0,19 mg/ml e levou-se ao ultrassons até dissolver. Perfez-se o volume do balão com solvente e filtrou-se a solução com o sistema de filtração adequado.

Solução excipientes depois da filtração

Dissolveu-se de 185 mg de placebo para um balão volumétrico limpo e seco de 10ml com solução solvente e levou-se ao ultrassons até dissolução completa. Perfez-se o volume do balão com solvente. Filtrou-se a solução com filtros PVDF 0,45µm.

7.2.2 Preparação das soluções para a validação do método de impurezas do composto X

Preparação da fase móvel A

Preparou-se uma mistura de Acetonitrilo: Solução de Ácido Fosfórico (0,1%) nas proporções 50:50 (v/v).

Solução de Ácido Fosfórico 0,1 %: Num balão de 1 L diluiu-se 1 ml de Ácido ortofosfórico 85 % em água ultrapura e perfez-se o volume do balão com o mesmo solvente.

Preparação da fase móvel B

Num balão de 1 L diluiu-se 1 ml de Ácido ortofosfórico 85% em Acetonitrilo e perfez-se o volume do balão com o mesmo solvente.

Preparação da solução solvente

Preparou-se uma mistura de 400 volumes de uma solução de dihidrogenofosfato de potássio R 1,4g/L com pH ajustado a 4,0 com ácido fosfórico R e 600 volumes de acetonitrilo R.

Solução do branco

Encheu-se um vial de HPLC com a solução solvente, tapou-se e analisou-se imediatamente.

Solução padrão do composto X a uma concentração 0,4mg/ml

Pesou-se e dissolveu-se cerca de 10mg do composto X para um balão volumétrico de 25ml, com solução solvente e levou ao ultrassons até completa dissolução. Perfez-se o volume do balão com solução solvente. Prepararam-se duas soluções stock.

Solução padrão do composto X a uma concentração 0,002mg/ml (0,5%) para a avaliação da performance, precisão do sistema, filtração, estabilidade da solução padrão, LD e LQ e linearidade

Diluiu-se 1ml de cada uma das soluções anteriores ($C=0,4\text{mg/ml}$) para um balão de 200ml e perfez-se o volume do balão com solução solvente.

No estudo da filtração foram testados filtros PVDF Millipore, Nylon VWR e GHP Pall de $0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro de membrana.

Para a determinação do limite de detecção e quantificação, foram feitas várias diluições até se determinar cada um destes limites (0.003%, 0.004%, 0.005%, 0.006% e 0.007%).

A linearidade foi estudada por análise de diluições feitas a partir destas soluções a 0,002 mg/ml e 0,4 mg/ml. Foram analisadas soluções padrão que continham o composto X nas concentrações de LQ, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6% e 1.0%.

Solução stock de impureza A, B, C e D

Pesou-se cerca de 0,4 mg de cada uma das impurezas (A, B, C e D) para um balão volumétrico de 10 ml e dissolveu-se com solvente, levou-se ao ultrassons. Perfez-se o volume do balão com solvente.

Solução stock de impureza E

Pesou-se cerca de 0,2 mg de impureza E para um balão volumétrico limpo e seco de 5 ml e dissolveu-se com solvente. Perfez-se o volume do balão com solvente.

Solução padrão do composto X a uma concentração 0,002 mg/ml (0,5%) + mistura de impurezas (no limite de especificação)

Diluiu-se 0,313 ml da solução padrão de concentração $C=0,4$ mg/ml, 1 ml da solução stock com as impurezas A, B, C e D e, 2,5 ml da solução stock de impureza E para um balão de 25 ml e perfez-se o volume do balão com solução solvente.

Solução stock de excipientes

Pesou-se cerca de 185 mg de mistura de excipientes para um balão volumétrico limpo e seco de 10 ml. Dissolveu-se com solução solvente e levou-se ao ultrassons até completa dissolução. Perfez-se o volume do balão com solvente. Diluiu-se 1 ml da solução stock anterior para um balão de 25 ml e perfez-se o volume do balão com solução solvente. Filtrou-se a solução com filtros PVDF 0,45 μm .

Solução formula reconstituída do composto X a uma concentração 0,002mg/ml com excipientes

Diluiu-se para um balão volumétrico de 25 ml, 0,313 ml da solução padrão de concentração $C=0,4$ mg/ml e 1ml da solução stock de excipientes. Completou-se o volume do balão com solução solvente e filtrou-se a solução com filtros PVDF 0,45 μm .

Solução do composto X a uma concentração 0,002mg/ml com excipientes e impurezas (no limite da especificação) para estudo da selectividade e estabilidade das soluções amostra

Diluiu-se para um balão volumétrico de 25 ml, 0,313 ml da solução padrão de concentração $C=0,4$ mg/ml, 1 ml da solução stock com as impurezas A, B, C e D e, 2,5 ml da solução stock de impureza E, juntamente com 1 ml da solução stock de excipientes. Perfez-se o volume do balão com solução solvente e filtrou-se a solução com filtros PVDF 0,45 μm . Diluiu-se 0,313ml da solução padrão de concentração $C=0,4$ mg/ml, para um balão de 25ml e perfez-se o volume do balão com solução solvente.

7.3 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

7.3.1 Condições de validação do método do conteúdo do composto Y

As condições cromatográficas utilizadas durante todo o processo de validação do método de conteúdo são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas utilizadas no método de conteúdo do composto conservante Y.

<i>Parâmetro</i>	<i>Condição</i>
Coluna cromatográfica	Hypersil BDS C18 (5 µm, 250 x 4.6 mm)
Fase móvel	ACN:H ₂ O: H ₃ PO ₄ (25%), 600:400:1,0 (v / v)
Fluxo	1,5ml/min
Solvente	Fase móvel
Temperatura do forno	25 °C
Temperatura das amostras	25 °C
Deteção	UV 290 nm
Tempo de corrida	10 minutos
Volume de Injecção	100 µl

7.3.2 Condições de validação do método das impurezas do composto X

As condições cromatográficas utilizadas durante todo o processo de validação do método de conteúdo são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Condições cromatográficas utilizadas no método de validação das impurezas do composto X.

<i>Parâmetro</i>	<i>Condição</i>		
Coluna cromatográfica	Gemini C18 (3µm, 50 x 4.6mm)		
Fase móvel A	Acetonitrilo:H ₃ PO ₄ (0,1%) (50:50) (v/v)		
Fase móvel B	H ₃ PO ₄ (0,1%) em acetonitrilo		
Gradiente	Tempo/min	Fase móvel A (% v/v)	Fase móvel B (% v/v)
	0-4.5	100	0
	4.5-4.6	100-95	0-5
	4.6-8.0	95-25	5-75
	8.0-11.5	25	75
	11.5-11.6	25-100	75-0
	11.6-13.0	100	0
Fluxo	3,0ml/min		
Solvente	KH ₂ PO ₄ (1,4g/L):ACN (60:40) (v/v)		
Temperatura do forno	20 ° C		
Temperatura das amostras	4 ° C		
Deteção	UV 238nm		
Tempo de corrida	13 minutos		
Volume de Injecção	20 µl		

CAPÍTULO 8 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DA ANÁLISE DO CONTEÚDO DO COMPOSTO Y

Durante a validação do método do conteúdo do composto Y foi tido em consideração que a concentração de trabalho do padrão do composto Y é de 0,004 mg/mL (4 µg/mL), enquanto nas amostras a concentração é de 3,8 µg/mL.

8.1.1 Filtração das soluções

Uma das etapas mais importantes numa análise de HPLC é a preparação das amostras, principalmente durante a etapa da filtração. Esta etapa permite remover partículas existentes na solução da amostra sem reter contudo o composto que se pretende analisar. Neste sentido foram utilizados filtros de seringas com poros de 0,45 µm de forma a reter todas as partículas superiores a este diâmetro.

Podem ser encontrados no mercado vários tipos de membrana com a mesma dimensão de poros, como por exemplo, celolose regenerada, nylon, polipropileno (GHP) e teflon. A escolha destes filtros baseia-se na aplicação pretendida e nos solventes utilizados.

Esta análise consistiu em analisar vários tipos de membranas com 0,45 µm de diferentes fornecedores, de forma a verificar se estes interfeririam nos resultados obtidos com a amostra. Neste sentido foram avaliados três tipos de membranas, GHP, Nylon e PVDF que, permitiram escolher o melhor sistema de filtração para a preparação das amostras e padrões na restante validação e posteriormente na análise de rotina.

O teste de filtração consistiu na filtração de uma solução padrão de princípio activo, nomeadamente de seis filtros GHP, seis filtros Nylon e seis filtros de PVDF, dos fornecedores Pall, VWR e Millipore, respectivamente.

Foi analisada uma solução padrão contendo o composto conservante Y a uma concentração de 0,00385 mg/ml antes e depois da filtração, sendo cada um dos vasos injectados uma única vez.

A resposta média obtida para o conjunto de filtrações foi comparada com a resposta do padrão não filtrado, sendo apresentado na Tabela 7 os resultados obtidos.

Tabela 7- Resultados das soluções não filtradas e filtradas com filtros GHP Pall, PVDF Millipore e Nylon VWR com 0,45µm.

Amostra	Sem filtração		Filtração					
			GHP Pall		PVDF Millipore		Nylon VWR	
	Área	RF	Área	RF	Área	RF	Área	RF
#1	259043	$6,728 \times 10^{+7}$	258409	$6,712 \times 10^{+7}$	258763	$6,721 \times 10^{+7}$	258565	$6,716 \times 10^{+7}$
#2	258553	$6,716 \times 10^{+7}$	258373	$6,711 \times 10^{+7}$	258621	$6,717 \times 10^{+7}$	259148	$6,731 \times 10^{+7}$
#3	258847	$6,723 \times 10^{+7}$	258471	$6,714 \times 10^{+7}$	258358	$6,711 \times 10^{+7}$	258769	$6,721 \times 10^{+7}$
#4	258738	$6,720 \times 10^{+7}$	258578	$6,716 \times 10^{+7}$	258545	$6,715 \times 10^{+7}$	259392	$6,737 \times 10^{+7}$
#5	258527	$6,715 \times 10^{+7}$	258033	$6,702 \times 10^{+7}$	256513	$6,663 \times 10^{+7}$	260720	$6,772 \times 10^{+7}$
#6	258601	$6,717 \times 10^{+7}$	258484	$6,714 \times 10^{+7}$	259555	$6,742 \times 10^{+7}$	260458	$6,765 \times 10^{+7}$
	Média	$6,720 \times 10^{+7}$	Média	$6,711 \times 10^{+7}$	Média	$6,711 \times 10^{+7}$	Média	$6,740 \times 10^{+7}$
			Desvio	0,126%	Desvio	0,126%	Desvio	-0,305%
			Valor p	0,0156	Valor p	0,0595	Valor p	0,0595

A comparação das variâncias entre os conjuntos de dados apresentados permitiu identificar se existiriam alterações significativas entre os vários sistemas de filtração em relação aos resultados da solução não filtrada. Assim, o teste F bilateral permitiu verificar se havia alterações significativas entre os vários sistemas de filtração e posteriormente fez-se uma análise pelo teste t-student que permitiu concluir se existiria alguma diferença significativa entre as respectivas médias (verificado pelo valor *p*). Segundo os valores apresentados na Tabela 7, demonstram que as amostras podem ser filtradas através de filtros PVDF do fornecedor Millipore, e de Nylon, do fornecedor VWR, uma vez que os resultados obtidos após filtração com estes dois tipos de filtros e o resultado do padrão não filtrado são estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) e com um desvio inferior a 2%. Os resultados obtidos após filtração através de filtros GHP, não são estatisticamente semelhantes, devendo-se possivelmente a pequenas variações, uma vez que o desvio da resposta em relação ao padrão não filtrado é de apenas 0,13%.

Atendendo a que o desvio entre as médias dos RF deve ser inferior a 2 %, segundo a especificação, então conclui-se que filtros PVDF Millipore e Nylon VWR são os mais indicados pois apresentam um desvio menor em relação à solução não filtrada, 0.13 % e 0.31 % respectivamente.

8.1.2 Selectividade

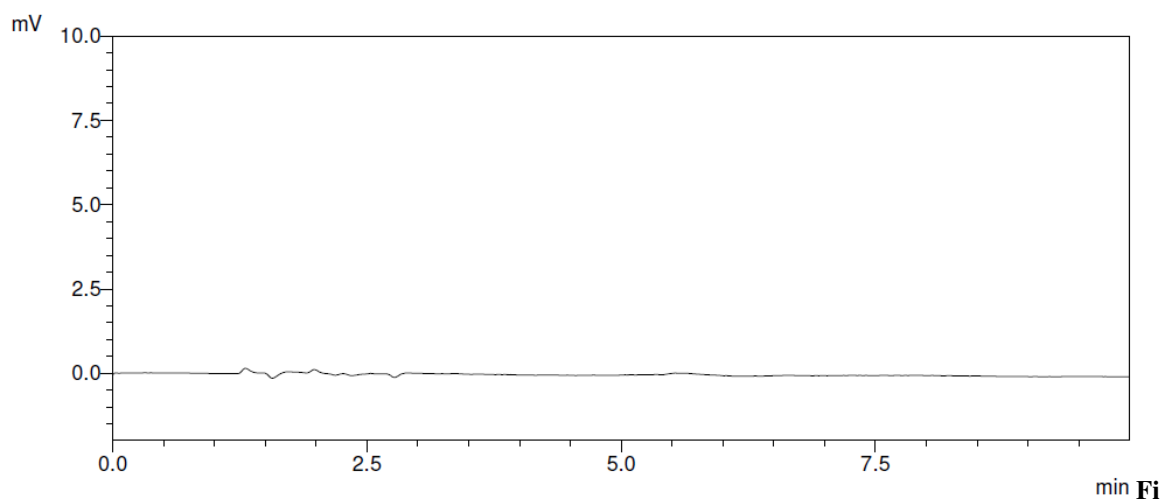
Qualquer amostra de uma fórmula farmacêutica pode conter para além do princípio activo, excipientes necessários à formulação, como conservantes e componentes do revestimento.

Depois de se saber qual o sistema de filtração a utilizar, avaliou-se a selectividade de forma a garantir que o método analítico consegue estimar de forma inequívoca o composto de interesse. Foram preparadas as seguintes soluções conforme já descrito anteriormente:

- Branco
- Padrão do composto Y ($C = 0,004 \text{ mg/mL}$)
- Padrão do composto X ($C = 2 \text{ mg/mL}$)
- Solução da fórmula reconstituída (CompostoX+excipientes+CompostoY) depois de filtrado ($C_{\text{composto X}} = 2 \text{ mg/mL}$ / $C_{\text{Composto Y}} = 0,0038 \text{ mg/mL}$)
- Mistura de excipientes depois de filtração

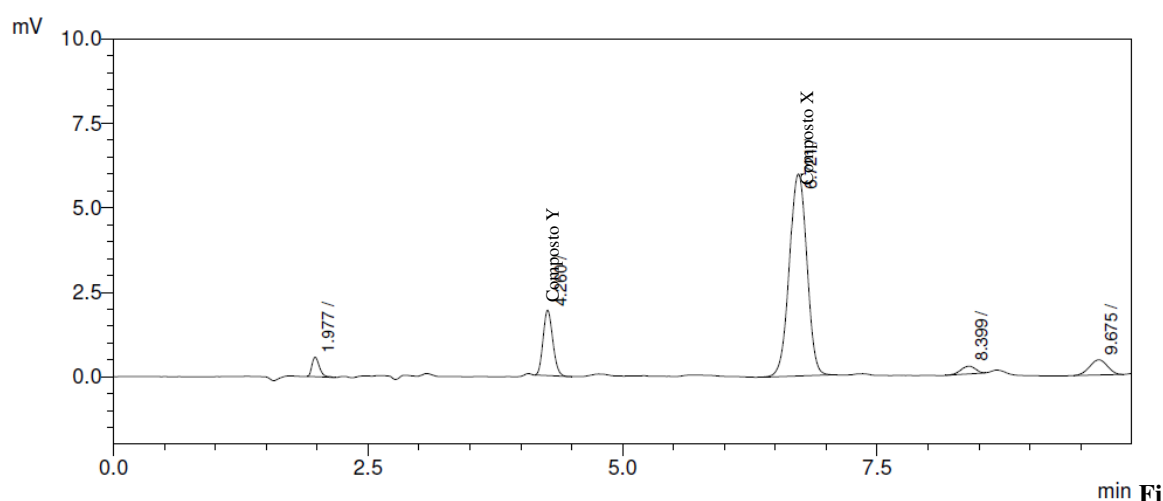
Foram comparados os vários cromatogramas referentes a cada uma das soluções referidas acima de forma a ver se existiria alguma interferência entre os picos dos excipientes, o composto X e o composto Y.

A Figura 18 representa o cromatograma da solução do branco e permitiu obter uma linha de base praticamente constante, não contribuindo com picos interferentes.



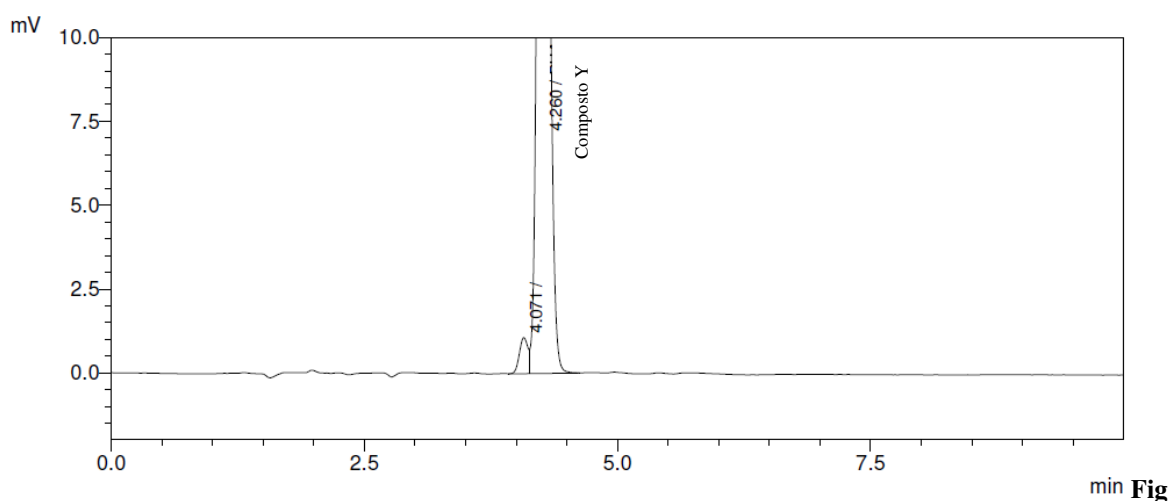
gura 18 - Cromatograma obtido pela da solução do branco.

Na Figura 19 está representado o composto X que eluiu aos 6,721 minutos, contudo também foi possível identificar o composto Y aos 4,260 minutos. Não é de estranhar este facto, uma vez que o composto Y é um conservante do composto X que evita a sua oxidação, e é de tal forma importante que a substância activa X vem fortificada com este antioxidante.



gura 19 - Cromatograma obtido da solução padrão do composto X.

O composto Y também foi analisado individualmente, Figura 20, o qual como já verificado na figura anterior, eluí aos 4,260 minutos.



ura 20 - Cromatograma obtido da solução padrão do composto Y.

O cromatograma referente à mistura de excipientes pode ser observado na Figura 21, esta solução é composta por todo o conjunto de componentes do produto final, contendo também o composto Y. Neste sentido, pode dizer-se que esta solução contém todos os componentes presentes num comprimido final, com a exceção do composto activo (composto X). Verifica-se que os picos com tempos de retenção 1.3, 1.4, 1.6, 1.8, 2.1 e 6.7 min são devido aos excipientes presentes na formulação com exceção do composto Y, uma vez que por comparação com a figura 20 se concluiu que os picos relativos ao composto Y têm tempos de retenção de 4.0 e 4.3 min.

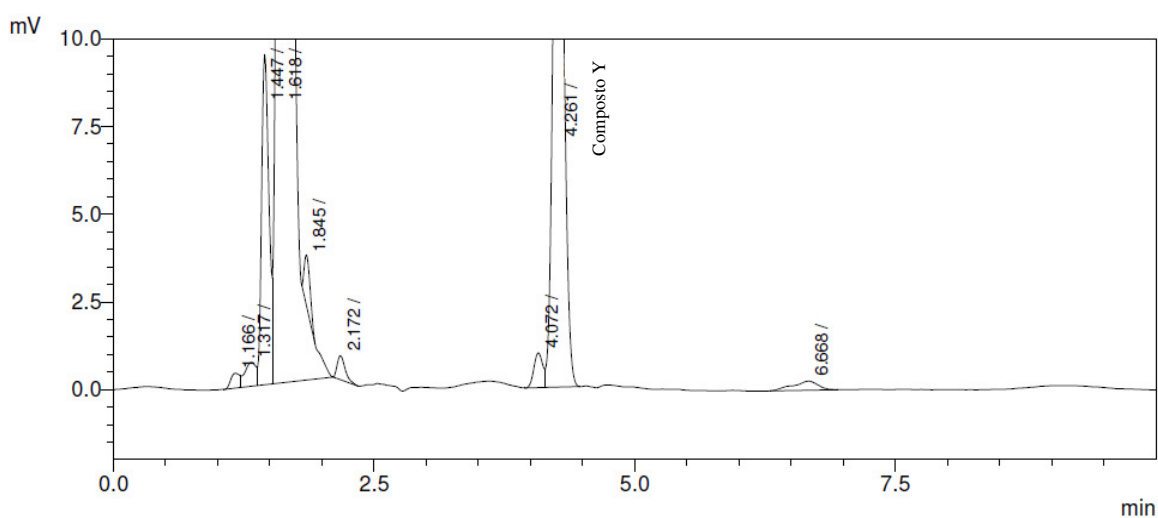


Figura 21 - Cromatograma obtido da solução de excipientes.

O cromatograma seguinte, Figura 22, representa a fórmula reconstituída do medicamento, ou seja, contém todos os excipientes já analisados e ainda o composto X. De uma maneira geral, esta fórmula reconstituída tenta representar o cromatograma que seria esperado, se fosse analisado um comprimido deste composto.

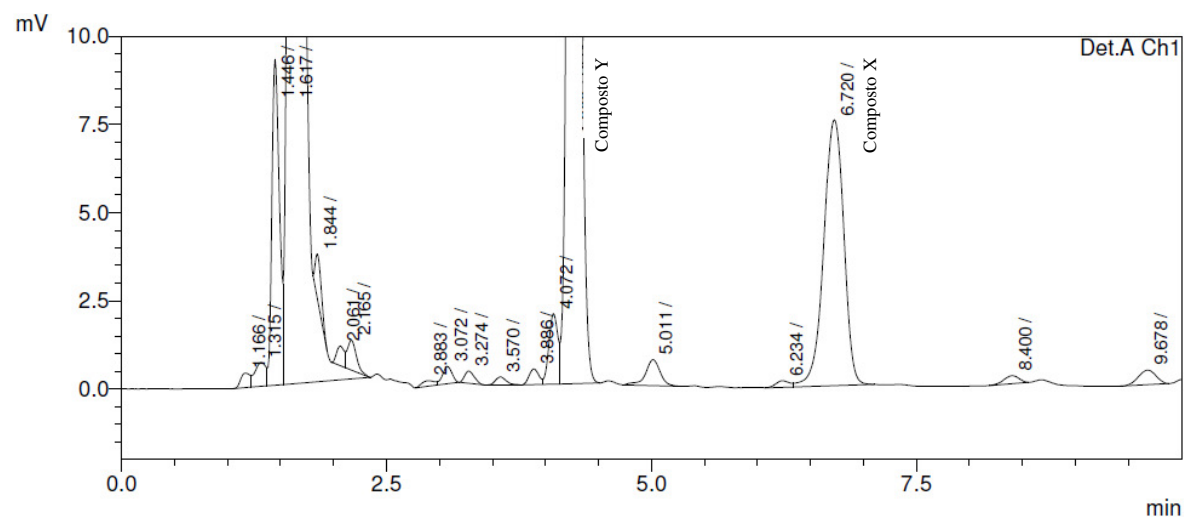


Figura 22 - Cromatograma obtido da solução da fórmula reconstituída.

Os cromatogramas do branco e dos excipientes foram utilizados para identificação dos vários picos. A partir dos cromatogramas e dos resultados apresentados acima, pode-se concluir que não há interferência de impurezas ou excipientes com o pico do composto Y.

A avaliação quantitativa foi feita através das percentagens de interferência dos componentes presentes nas amostras. A equação seguinte permitiu verificar se existiria alguma interferência entre os excipientes ou o composto X com o composto Y encontrando-se os resultados obtidos apresentados na Tabela 8.

$$\% \text{ Interferência} = \left[\left(\frac{C_{st}}{A_{st}} \times \frac{A_{RF}}{C_{RF}} \right) - 1 \right] \times 100$$

onde:

C_{st} – Concentração do padrão do composto Y (mg/ml)

C_{RF} – Concentração do composto Y na fórmula reconstituída (mg/ml)

A_{RF} – Área do composto Y na fórmula reconstituída

A_{st} – Área do composto Y na solução padrão

Tabela 8 - Resumo dos dados obtidos pelos cromatogramas em análise.

	Composto Y				
	Concentração real do composto Y (mg/mL)	RT (min)	Area #1	Area #2	Média (n=2)
Padrão composto Y	0,0040	4,260	272071	272189	272130
Fórm. Reconstituída	0,0038	4,260	256929	257556	257243
			% interferência		-0,12%

Avaliando os resultados obtidos, apresentados pela Tabela 7, verifica-se que não existe interferência significativa entre o composto Y e o princípio activo em estudo (composto X), uma vez que a percentagem de interferência (-0,12%) não ultrapassa valor limite (2,0%). Pode-se então concluir, que o método é selectivo para o composto Y, não havendo interferência por parte da substância activa X e excipientes nem ao nível das áreas dos picos nem no perfil cromatográfico.

8.1.3 Linearidade

A linearidade caracteriza-se pela capacidade do método analítico gerar resultados directamente proporcionais à concentração do composto Y no solvente (C) em função da área do pico (Y), sob a forma de $Y=a+bC$.

Neste sentido, a linearidade foi avaliada pela análise de 5 soluções padrão de diferentes concentrações do composto Y (60%, 80%, 100%, 120% e 140%), considerando que a concentração correspondente a 100% é de 0,004 mg/ml (4 µg/ml). Estas soluções foram preparadas a partir de duas soluções stock independentes resultando em soluções de concentração do composto Y de: 2.444 µm/ml, 3.259 µm/ml, 4.018 µm/ml, 4.822 µm/ml, 5.625 µm/ml.

As soluções foram injectadas em duplicado e os resultados das áreas são apresentadas na Tabela 9, bem como as concentrações reais das várias soluções preparadas. Esta análise da linearidade foi avaliada a partir da determinação do desvio padrão relativo (RSD) dos factores de resposta, interacção do eixo dos y's e o coeficiente de correlação (r).

Tabela 9 - Resultados obtidos das injeções das soluções relativos à linearidade.

Soluções Padrão	Concentração solução Stock (mg/ml)	Diluição (ml)	Concentração final (mg/mL)	Area (#1)	Area (#2)	Média Área (n=2)	RF
60%	0,102	1,2/50	$2,444 \times 10^{-3}$	165869	165728	165799	$6,784 \times 10^{+7}$
80%	0,102	1,6/50	$3,259 \times 10^{-3}$	217717	217977	217847	$6,684 \times 10^{+7}$
100%	0,100	2/50	$4,018 \times 10^{-3}$	268492	268549	268521	$6,683 \times 10^{+7}$
120%	0,100	2,4/50	$4,822 \times 10^{-3}$	324664	324606	324635	$6,732 \times 10^{+7}$
140%	0,100	2,8/50	$5,625 \times 10^{-3}$	375050	374751	374901	$6,665 \times 10^{+7}$
						Média	$6,710 \times 10^{+7}$
						RSD	0,718%

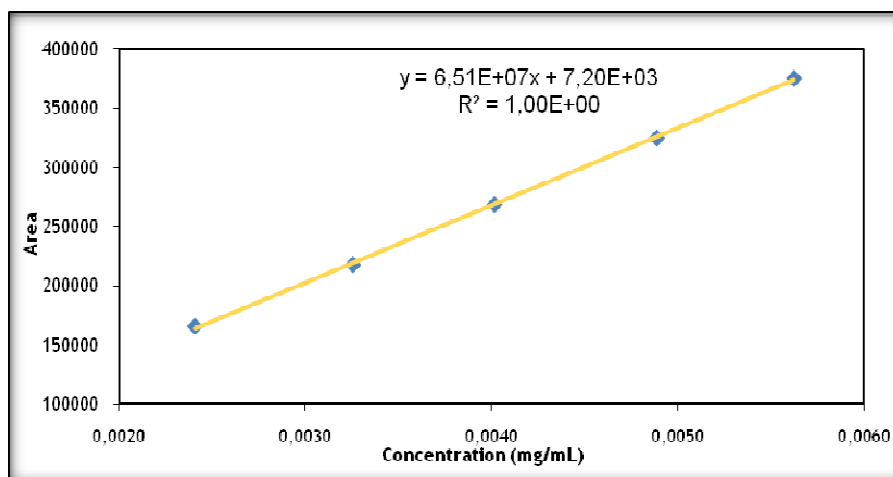


Figura 23 - Representação gráfica dos resultados obtidos nas várias concentrações que permitiu obter a recta de linearidade do método analítico.

O resultado da média destes RF's permitiram, posteriormente calcular o desvio padrão relativo dos cinco níveis de concentração, tendo-se obtido o valor de 0,72%.

Através dos resultados apresentados na Tabela 8, procedeu-se à construção do gráfico da área versus concentração, como representado na Figura 23, representada pela equação da recta.

Os resultados das soluções padrão apresentam-se lineares na gama de concentração, desde a concentração mais baixa analisada $2,44 \mu\text{m/ml}$ até à concentrada mais alavada

5.625 µm/ml. Obteve-se a equação da recta $y=6,51 \times 10^{-7}x+7,20 \times 10^{-3}$ e um coeficiente de correlação de 0,9999 (superior a 0,999), indicando uma boa relação entre a área e a concentração do composto Y.

A equação de regressão linear aplicada aos resultados, apresenta um valor para a ordenada na origem que indica o erro sistemático do método. Idealmente seria obter-se a ordenada na origem o mais próximo de zero. O grau de proximidade de zero foi avaliado relativamente à resposta do limite de aceitação 4.018 µm/ml, tendo sido obtido um valor de 1,16%. Atendendo a que o limite de aceitação para este desvio à intercepção no eixo dos y's deve ser inferior a 3%, pode considerar-se que o desvio obtido é aceitável para a gama de trabalho.

O valor do declive da recta, também designado coeficiente de regressão, indica a sensibilidade analítica, ou seja, quanto maior o declive maior a sensibilidade. A sensibilidade mede a relação entre o sinal do instrumento e a concentração da solução analisada. Assim, um declive de $6,51 \times 10^{-7}$ significa que um aumento de 1 mg/ml na concentração resulta num aumento de $6,51 \times 10^{-7}$ unidades no sinal.

Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que o método analítico é capaz de gerar resultados directamente proporcionais à concentração do composto Y no solvente no intervalo da gama de trabalho testada (2,444 µm/ml a 5,625 µm/ml).

8.1.4 Exactidão

A análise da exactidão permite expressar, em percentagem, o grau de concordância entre o valor de referência aceite (valor teórico) e o valor encontrado com o método analítico.

Para a análise da exactidão foram preparadas três soluções independentes da fórmula reconstituída com concentrações a 60%, 100% e 140% (2,3 µg/ml, 3.8 µg/ml e 5,32 µg/ml, respectivamente), usando filtros de PVDF 0,45 µm. Cada nível de concentração consiste em três preparações independentes e foram feitas injeções simples de cada solução.

Esta análise pressupõe a verificação de uma calibração feita com duas soluções padrão de forma a verificar se o equipamento se encontra em conformidade para a análise. Esta análise consistiu em injectar 5 vezes a solução padrão 1 e uma vez a solução padrão 2,

como descrito no capítulo 6. Obteve-se uma recuperação de 98,9% entre os factores de resposta obtidos nas duas soluções e um RSD de 0,44%. Para que a conformidade seja provada é necessário que se verifique uma recuperação entre os factores de resposta obtidos das duas soluções padrão entre os 97 e os 103% e, um RSD inferior ou igual a 2%. Atendendo a que os valores obtidos para a recuperação e para o RSD correspondem aos limites especificados, considerou-se o sistema apto para a continuação da análise. Calculou-se a concentração real do composto Y nas soluções da fórmula reconstituída preparadas como descrito anteriormente considerando os três níveis de concentração pretendidas (60, 100 e 120%), tendo sido preparadas a partir de duas soluções stock do composto Y. Na Tabela 10 encontram-se as concentrações e os resultados das recuperações de cada uma destas soluções. Para cada nível de concentração foi calculado a média da recuperação, o desvio padrão e o intervalo de confiança.

Tabela 10 - Resumo das recuperações obtidas nos três níveis de concentração.

Nível concentração	Amostra	Área	Peso (mg)	Volume inicial (mL)	Diluição (v/v)	Concentração real (mg/ml)	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD da Média da Recuperação (%)
60	#1	153691	9,57	50	0,6/50	0,00230	101,16	100,15	1,12
60	#2	150241	9,55			0,00229	99,10		
60	#3	153336	9,57			0,00230	100,93		
100	#1	253453	9,55	50	1/50	0,00382	100,31	100,24	0,07
100	#2	253846	9,57			0,00383	100,25		
100	#3	253102	9,55			0,00382	100,17		
140	#1	349362	9,55	50	1,4/50	0,00535	98,76	100,00	1,18
140	#2	354238	9,55			0,00535	100,14		
140	#3	358413	9,57			0,00536	101,11		

O cálculo da exactidão de cada uma das soluções foi obtida através das equações seguintes:

$$\text{Concentração real (mg/ml)} = \frac{\text{Área}}{\text{MRF}}$$

e

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração real}}{\text{Concentração teórica}}$$

Tendo-se obtido uma recuperação média de 100.15, 100.24 e 100.00% e um RSD de 1.12, 0.07 e 1.18, respectivamente para as soluções de 60, 100 e 140%.

Por fim foram calculados os intervalos de confiança para 95% a partir da equação seguinte, tendo-se obtido os resultados apresentados na Tabela 11.

$$CI = R \pm \frac{RSD \times t_{x\%,n-1}}{\sqrt{n}}$$

Tabela 11 - Intervalos de confiança encontrados para cada nível de concentração.

Nível concentração	Intervalo de confiança 95%
60%	97,62-103,18
100%	100,07-100,41
140%	97,07-102,93

Pretende-se pelo procedimento analítico conseguir-se quantificar o composto Y de forma a que a recuperação seja próxima de 100%.

A performance do sistema cromatográfico é controlada ao longo da sequência de análise através da injeção de solução padrão após cada seis amostras consecutivas analisadas, estando o valor da recuperação do controlo dentro do intervalo 97% e 103%. No caso desta análise foi introduzido um padrão de controlo entre cada nível de concentração, tendo-se obtido uma recuperação de 99.71%, 100.45% e 100.34% depois de analisados os níveis de concentração 60%, 100% e 140%, respectivamente, o que permite considerar esta análise válida.

Observando os valores obtidos para a recuperação das diferentes concentrações (Tabela 10) e os respectivos RSD médios, que se encontram dentro dos limites especificados, 97-103% e $\leq 2\%$ respectivamente, pode-se concluir que o método analítico permite quantificar o composto Y das amostras com exactidão na gama de concentrações e nas condições analisadas.

8.1.5 Precisão do sistema

A precisão do sistema, também designada por repetibilidade de injeção, permite avaliar a precisão do equipamento (sistema cromatográfico) e do desempenho do método no momento em que as amostras são analisadas.

A precisão de sistema foi avaliada com solução padrão e com a fórmula reconstituída, durante três dias.

A precisão do sistema avalia a variabilidade entre várias injeções de uma mesma solução, neste caso foi feita uma análise de 5 injeções consecutivas de uma solução padrão do composto Y, com uma concentração de 4 µg/ml e de uma solução da fórmula reconstituída, contendo uma concentração de composto Y de 3,8 µg/ml, preparadas como descrito no capítulo 7.

Este teste foi realizado em 3 dias diferentes, com 3 soluções independentes de padrão e fórmula reconstituída preparadas no dia da análise, sendo apresentados os resultados na Tabela 12 e 13, respectivamente onde foi estimado o desvio padrão relativo.

Tabela 12 - Resultados das 5 injeções obtidas nas 3 diferentes soluções de composto Y a uma concentração de 4 µg/ml.

Injeção	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Area	RF	Area	RF	Area	RF
1	268757	$6,689 \times 10^{+7}$	279320	$6,406 \times 10^{+7}$	271868	$6,631 \times 10^{+7}$
2	268699	$6,687 \times 10^{+7}$	279095	$6,401 \times 10^{+7}$	271959	$6,633 \times 10^{+7}$
3	268467	$6,682 \times 10^{+7}$	278962	$6,398 \times 10^{+7}$	271475	$6,621 \times 10^{+7}$
4	269124	$6,698 \times 10^{+7}$	278742	$6,393 \times 10^{+7}$	271329	$6,618 \times 10^{+7}$
5	268555	$6,684 \times 10^{+7}$	278547	$6,389 \times 10^{+7}$	271619	$6,625 \times 10^{+7}$
	Média	$6,688 \times 10^{+7}$	Média	$6,398 \times 10^{+7}$	Média	$6,626 \times 10^{+7}$
	$RSD_{(n=5)}$	0,09%	$RSD_{(n=5)}$	0,11%	$RSD_{(n=5)}$	0,10%
	Média inter-dia					$6,570 \times 10^{+7}$
	RSD inter-dia					2,33%

Tabela 13 - Resultados das 5 injeções obtidas nos 3 diferentes soluções de composto Y a uma concentração de 3,8 µg/ml.

Injecção	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Área	RF	Área	RF	Área	RF
1	301337	$7,893 \times 10^{+7}$	297872	$7,758 \times 10^{+7}$	291135	$7,646 \times 10^{+7}$
2	301355	$7,894 \times 10^{+7}$	298113	$7,764 \times 10^{+7}$	291641	$7,659 \times 10^{+7}$
3	300194	$7,863 \times 10^{+7}$	296849	$7,731 \times 10^{+7}$	292720	$7,688 \times 10^{+7}$
4	302469	$7,923 \times 10^{+7}$	297277	$7,742 \times 10^{+7}$	292736	$7,688 \times 10^{+7}$
5	303484	$7,950 \times 10^{+7}$	297148	$7,739 \times 10^{+7}$	292556	$7,683 \times 10^{+7}$
	Média	$7,905 \times 10^{+7}$	Média	$7,747 \times 10^{+7}$	Média	$7,673 \times 10^{+7}$
	$RSD_{(n=5)}$	0,41%	$RSD_{(n=5)}$	0,18%	$RSD_{(n=5)}$	0,25%
	Média inter-dia					7,775E+07
	RDS inter-dia					1,52%

Analisando os resultados apresentados, verifica-se que os coeficientes de variação e os RSDs inter-dia e intra-dia são inferiores a 2%. Isto significa que o equipamento analítico possui uma precisão aceitável para a aplicação do método analítico em causa, sem desvios significativos no factor de resposta, tanto na análise de injeções consecutivas num só dia, como também quando analisadas soluções de concentrações semelhantes em dias distintos.

8.1.6 Repetibilidade/Precisão do método

Esta análise permite expressar a precisão do procedimento analítico nas condições de funcionamento, durante um curto intervalo de tempo. A precisão de um procedimento analítico caracteriza a variação dos resultados relativamente a um valor médio.

A análise da repetibilidade do método analítico, foi obtida a partir da avaliação dos resultados da exactidão utilizando os resultados dos diferentes níveis de concentração. As amostras foram preparadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e no mesmo dia. Cada solução foi preparada independentemente e injectada uma única vez, estando os resultados apresentados na Tabela 14.

Os limites dos RSD dos valores intra-dia, devem ser inferiores ou iguais a 2% e, atendendo aos resultados obtido para o RSD das médias das recuperações, pode-se concluir que, este método como sendo estável e preciso, quando se analisam diferentes amostras sob as mesmas condições num curto espaço de tempo.

Tabela 14 - Resultados da repetibilidade do procedimento analítico de quantificação do composto Y.

Nível concentração	Amostra	Concentração real (mg/ml)	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD da Média da Recuperação (%)
60	#1	0,00230	101,16	100,15	1,12
60	#2	0,00229	99,10		
60	#3	0,00230	100,93		
100	#1	0,00382	100,31	100,24	0,07
100	#2	0,00383	100,25		
100	#3	0,00382	100,17		
140	#1	0,00535	98,76	100,00	1,18
140	#2	0,00535	100,14		
140	#3	0,00536	101,11		

8.1.7 Estabilidade das soluções

As soluções analíticas são normalmente utilizadas durante um período de tempo relativamente curto, no qual o conteúdo da substância activa analisada permanece praticamente inalterado. A estabilidade é avaliada através do cálculo do desvio da resposta da análise de uma amostra num momento t relativamente à resposta inicial em t_0 .

A estabilidade da substância activa na solução padrão e na fórmula reconstituída foi avaliada a vários tempos. As soluções foram mantidas a 4°C.

Foram preparadas três soluções da solução padrão de concentrações 0.00404 mg/ml, 0.00407 mg/ml, 0.00409 mg/ml, e três soluções da fórmula reconstituída de concentrações 0.00382 mg/ml, 0.00383 mg/ml e 0.00383 mg/ml.

Inicialmente estava previsto que o estudo da estabilidade da solução padrão fosse feito nos tempos: $t=0$; $t = 24$ e $t = 48$ h, realizado ao longo de um fim-de-semana. No entanto tal não foi possível devido a uma falha de electricidade e consequentemente a uma paragem do equipamento, apenas foi possível avaliar os tempos $t=0$ e $t=72$ horas.

Atendendo a que, como verificado na Tabela 15, o composto Y da solução padrão, apresentava, às 72 horas, um desvio no RF de 0,81% relativamente ao RF a t=0. Assim, podemos considerar que a solução padrão é estável, à temperatura ambiente, durante pelo menos 72 horas. Se eventualmente o desvio entre factores de resposta fosse superior a 2% teria sido necessário repetir o ensaio na medida em que não tínhamos resultados intermédios e não saberíamos até quando a solução era estável.

Portanto foi considerada esta análise sem ser necessário haver uma repetição, considerando-se estável com segurança o padrão do composto Y, quando armazenado a temperatura ambiente durante pelo menos 72 horas.

No caso das soluções da fórmula reconstituída foi avaliada nos tempos pretendidos, tendo-se obtido um RSD de 1,33% na análise feita passado 24 horas (Tabela 16) e um RSD de 3,73% passados 48 horas (Tabela 17). Tendo em conta que a especificação é de 2%, apenas se pode garantir uma estabilidade das soluções com 24 horas depois de preparadas.

Tabela 15 - Resultados das soluções padrão do composto Y analisadas aos tempos 0h e 72h.

100%	t = 0 h					t=72 h					
	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF	
	#1	270844	271315	271080	0,12%	6,723×10 ⁺⁷	275392	275778	275585	0,10%	6,835×10 ⁺⁷
	#2	273868	273686	273777	0,05%	6,733×10 ⁺⁷	274436	274584	274510	0,04%	6,751×10 ⁺⁷
	#3	277141	276954	277048	0,05%	6,794×10 ⁺⁷	278975	278029	278502	0,24%	6,829×10 ⁺⁷
				Média	6,750×10 ⁺⁷				Média	6,805×10 ⁺⁷	
								Desvio (RSD entre t=0 e t=72 horas)		-0,81 %	

Tabela 16 - Resultados das soluções da fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h e 24.

100%	t = 0 h					t=24 h					
	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF	
#1	266235	257834	262035	2,27%	6,860×10 ⁺⁷	269816	269038	269427	0,20%	7,053×10 ⁺⁷	
#2	266628	265672	266150	0,25%	6,953×10 ⁺⁷	268701	268381	268541	0,08%	7,015×10 ⁺⁷	
#3	265884	265970	265927	0,02%	6,947×10 ⁺⁷	266824	266860	266842	0,01%	6,971×10 ⁺⁷	
					Média	6,920×10 ⁺⁷				Média	7,013×10 ⁺⁷
							Desvio (RSD entre t=0 e t=24 horas)		-1,33%		

Tabela 17- Resultados das soluções da fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h e 48.

100%	t = 0 h					t=48 h				
	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF	Area #1	Area #2	Área Média	RSD	RF
#1	266235	257834	262035	2,27%	6,860×10 ⁺⁷	275878	273052	274465	0,73%	7,185E+07
#2	266628	265672	266150	0,25%	6,953×10 ⁺⁷	275849	275378	275614	0,12%	7,200E+07
#3	265884	265970	265927	0,02%	6,947×10 ⁺⁷	274140	274263	274202	0,03%	7,163E+07
					Média	6,920×10 ⁺⁷			Média	7,183E+07
Desvio (RSD entre t=0 e t=48 horas)										-3,73%

Por condicionalismos técnicos não foi possível avaliar os tempos especificados para a análise dos padrões, contudo, através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a solução padrão é estável a 72h e que a solução da fórmula reconstituída é estável durante pelo menos 24h.

8.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE IMPUREZAS DO COMPOSTO X

Designa-se por impureza qualquer composto existente numa fórmula farmacêutica para além do princípio activo que o compõe. O conceito de pureza absoluta não existe, e neste sentido, as substâncias farmacêuticas inevitavelmente contêm impurezas, sejam elas provenientes de processos de síntese ou de degradação.

A avaliação de substâncias estranhas à formulação e que por qualquer mecanismo possam ser perigosas para a saúde devem ser avaliadas e monitorizadas, de forma a serem controladas segundo as regulamentações em vigor. Neste sentido foi validado o método de quantificação de impurezas existente numa fórmula farmacêutica do composto X, que permita controlar os seus teores tendo em conta aos limites estabelecidos pelas especificações.

8.2.1 Filtração

A filtração foi avaliada através da análise de comparação de soluções contendo substância activa e uma mistura de impurezas (A, B, C, D e E) a uma concentração de 0,5%, antes e depois de filtradas com filtros PVDF Millipore, VWR Nylon e GHP Pall de porosidade 0,45µm.

Foram analisados para cada tipo de membrana, três filtros e os filtrados obtidos foram injectados uma única vez no sistema cromatográfico. A diferença entre o antes e depois da filtração foi determinada em termos de percentagem de alteração no fator de resposta (RF), através da equação:

$$\% \text{ _desvio} = \frac{RF_{\text{antes filtração}} - RF_{\text{depois filtração}}}{\left(\frac{RF_{\text{antes filtração}} + RF_{\text{depois filtração}}}{2} \right)} \times 100$$

Onde $RF_{\text{antes filtração}}$ é o factor de resposta antes da filtração e $RF_{\text{depois filtração}}$ é o factor de resposta depois da filtração.

Foi feito um teste t depois de realizado um teste F e de se concluir se os desvios não são estatisticamente semelhantes, e avaliado o valor de p entre a solução não filtrada e cada uma das soluções filtradas. As impurezas foram analisadas individualmente para um nível de confiança de 95%, e um valor de p superior a 0,05, os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 18.

O limite para o desvio permitido entre as soluções não filtradas e filtradas sem alterações significativas é de 2%. Analisando os resultados da Tabela 17, pode-se concluir que o sistema de filtração não alterou a solução de análise, uma vez que não houve retenção do pico de impureza e/ou consequentemente uma influência do filtro na determinação quantitativa da substância activa. Apesar da impureza B não constar na lista do plano de validação foi testada de igual modo, podendo qualquer tipo de filtro ser utilizado para a preparação das amostras. Assim, pode-se concluir que apenas os filtros GHP para o composto X é que não são aconselhados uma vez que apresentaram um desvio superior a 2% (em valor absoluto).

Tabela 18 - Resultados obtidos pelas filtrações.

	Filtros	Média dos RF		Desvio %	Valor <i>p</i> obtido por Test <i>t</i>
		Solução não filtrada	Solução filtrada		
Impureza B	GHP Pall	$1,548 \times 10^{+7}$	$1,528 \times 10^{+7}$	1,35%	0,071
	PVDF Millipore		$1,533 \times 10^{+7}$	1,03%	0,315
	Nylon VWR		$1,539 \times 10^{+7}$	0,62%	0,345
Impureza C	GHP Pall	$1,56 \times 10^{+7}$	$1,575 \times 10^{+7}$	-1,05%	0,358
	PVDF Millipore		$1,564 \times 10^{+7}$	-0,37%	0,629
	Nylon VWR		$1,531 \times 10^{+7}$	1,79%	0,072
Impureza D	GHP Pall	$5,380 \times 10^{+6}$	$5,422 \times 10^{+6}$	-0,78%	0,308
	PVDF Millipore		$5,407 \times 10^{+6}$	-0,50%	0,313
	Nylon VWR		$5,371 \times 10^{+6}$	0,17%	0,67
Impureza E	GHP Pall	$1,603 \times 10^{+8}$	$1,622 \times 10^{+8}$	-1,16%	0,026
	PVDF Millipore		$1,598 \times 10^{+8}$	0,31%	0,362
	Nylon VWR		$1,603 \times 10^{+8}$	0,01%	0,906
Impureza A	GHP Pall	$1,086 \times 10^{+7}$	$1,100 \times 10^{+7}$	-1,29%	0,027
	PVDF Millipore		$1,077 \times 10^{+7}$	0,76%	0,489
	Nylon VWR		$1,082 \times 10^{+7}$	0,30%	0,621
Composto X	GHP Pall	$1,638 \times 10^{+7}$	$1,687 \times 10^{+7}$	-2,93%	0,071
	PVDF Millipore		$1,660 \times 10^{+7}$	-1,33%	0,104
	Nylon VWR		$1,637 \times 10^{+7}$	0,07%	0,874

8.2.2 Selectividade

As amostras de uma fórmula farmacêutica podem conter para além do princípio activo, excipientes e impurezas (produtos de degradação). O método analítico deve ser capaz de quantificar inequivocamente o princípio activo na presença dos componentes passíveis de estarem na amostra.

Na análise das impurezas relacionadas com o composto X, foram utilizados dois equipamentos de HPLC segundo as mesmas condições, contudo de marcas diferentes (Waters e Shimadzu). Nas Figuras 25 e 26, estão representados os cromatogramas obtidos de amostras com um equipamento Waters e Shimadzu, respectivamente. Seria de esperar um resultado muito semelhante nos dois equipamentos, contudo, como representado na Figura 26 o equipamento Shimadzu parece ser mais sensível a este método, uma vez que consegue diferenciar duas impurezas (Impureza C e B) enquanto que no equipamento Waters apenas distingue uma impureza.

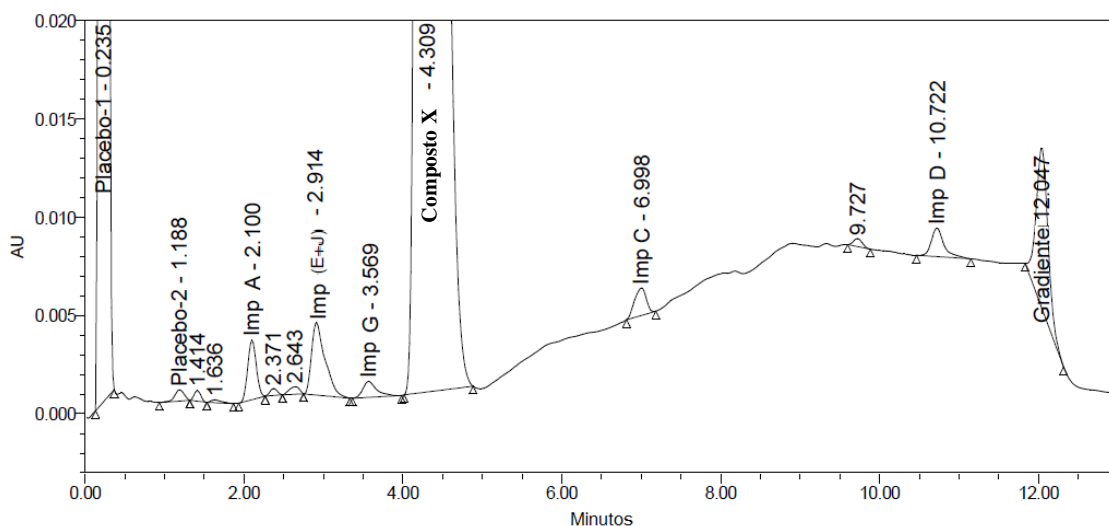


Figura 24 - Cromatograma de uma amostra analisada num equipamento Waters.

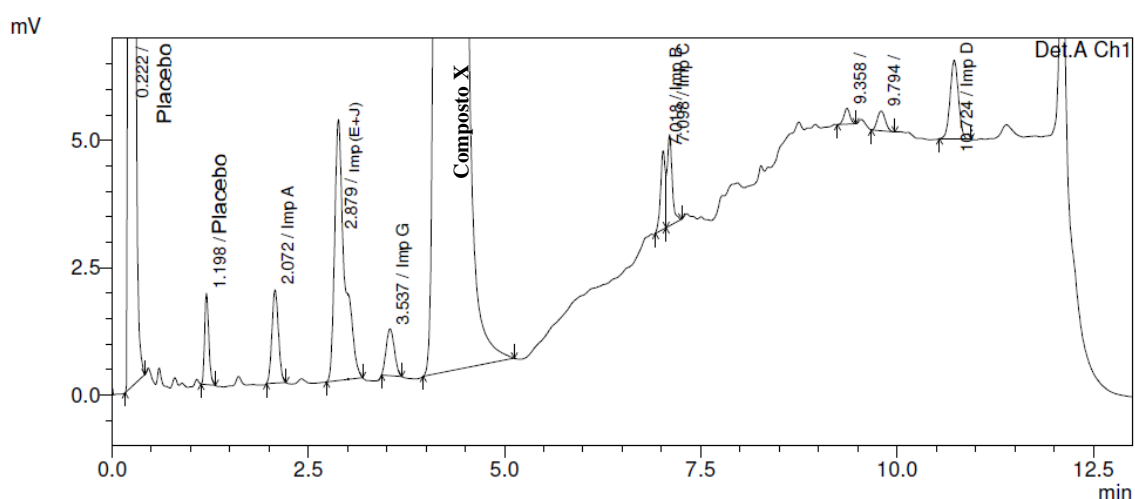


Figura 25 - Cromatograma de uma amostra analisada por um equipamento Shimadzu.

Atendendo á sensibilidade do equipamento Shimadzu, a validação do método foi feita apenas neste equipamento, sendo distinguido como o mais adequado para as posteriores análises de rotina.

Tal como no método anterior, a selectividade foi avaliada obtida pela comparação do perfil cromatográfico obtido para cada impureza conhecida, mistura de excipientes e solventes.

A selectividade foi avaliada por injeção das seguintes soluções:

- Branco – Solvente
- Solução padrão do composto X a 0,002 mg/ml

- Mistura de impurezas
- Mistura de Excipientes
- Fórmula reconstituída (Composto X + Mistura de excipientes)
- Composto X (100%) + Mistura de excipientes + Impurezas (nível de especificação)

Foram injectados um padrão do composto activo X e os excipientes separadamente, bem como das impurezas conhecidas que foram fortificadas ao nível da especificação, estes, estão representados nas seguintes Figura 27, 28 e 29, respectivamente.

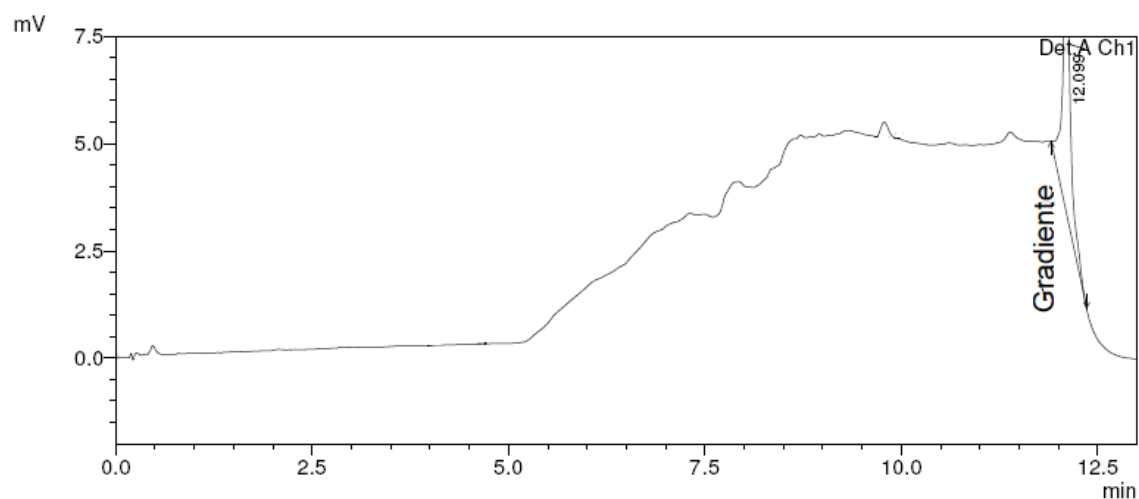


Figura 26 - Cromatograma de uma injeção do branco (solvente).

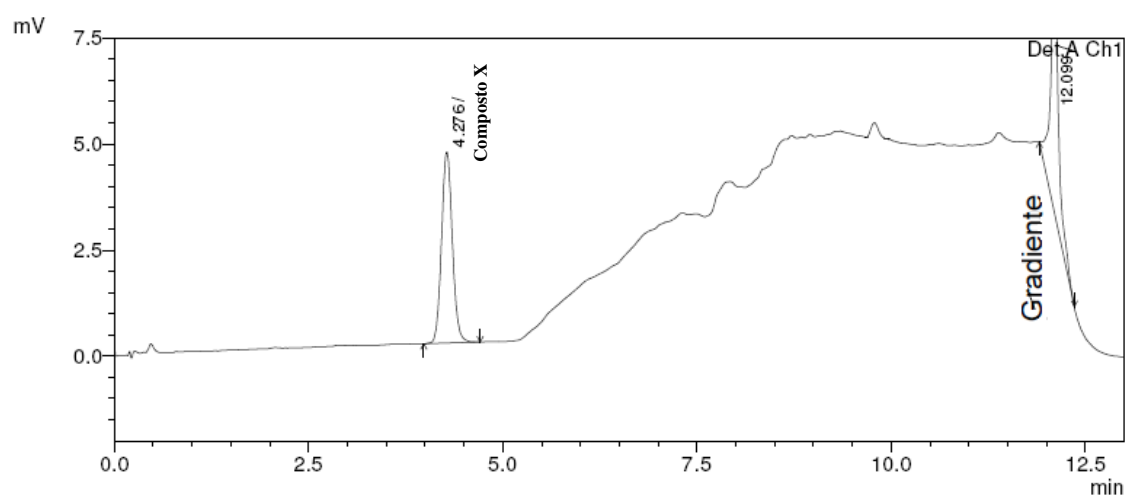


Figura 27 - Cromatograma que representa o padrão do composto X.

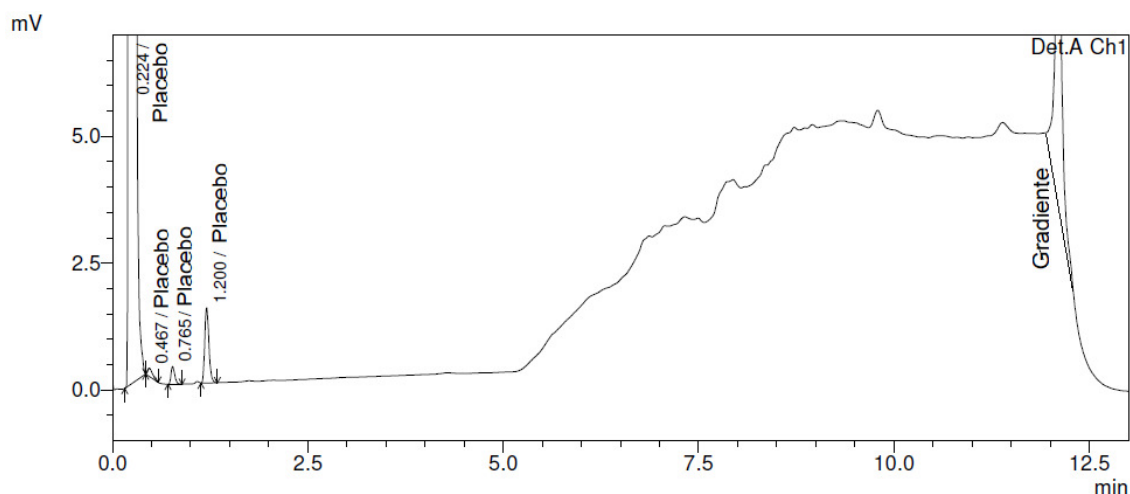


Figura 28 - Cromatograma de uma injeção dos excipientes presentes na formulação.

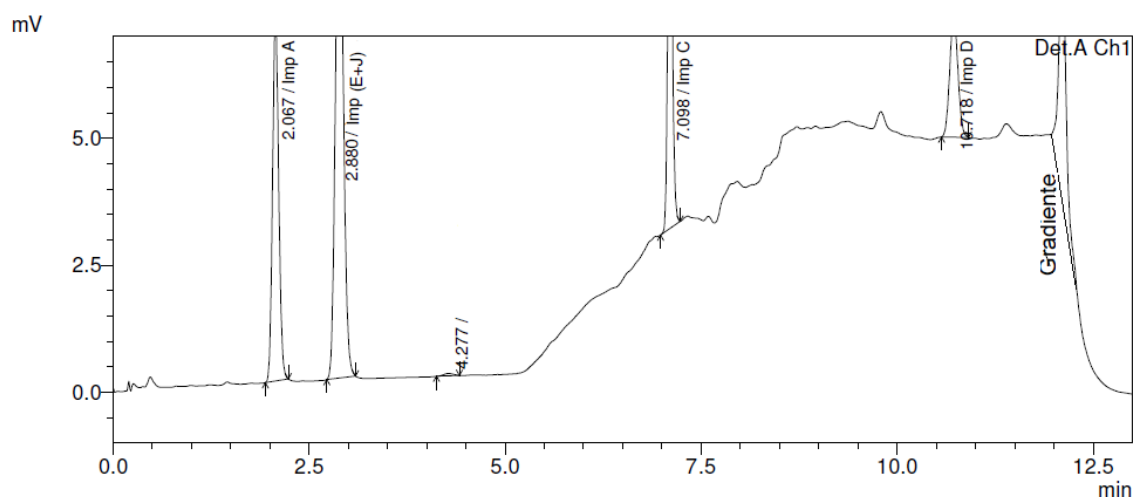


Figura 29 - Cromatograma da solução padrão de mistura de impurezas conhecidas fortificadas.

De forma a verificar se existiria alguma interferência dos excipientes e das impurezas no pico do composto activo, foi preparada uma solução mistura de todos os componentes da formulação, Figura 30.

Foi também injectado uma solução solvente que, serviu como branco, de forma a serem identificados os picos provenientes do solvente usado na preparação das soluções amostra e padrões (Figura 26). A observação do cromatograma do branco é bastante importante, pois permite verificar se o sistema da coluna e de gradiente está estável de forma a realizar a análise dos padrões e das amostras. A identificação dos picos referentes ao branco permite depois na análise das amostras identificar um certo pico como sendo do solvente e não de forma incorrecta como sendo impureza.

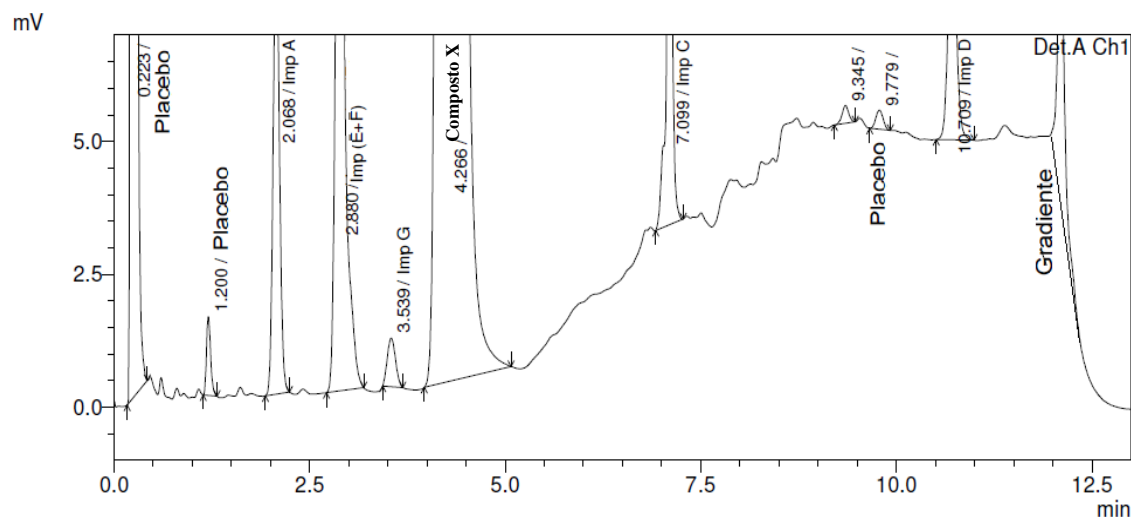


Figura 30 - Cromatograma de uma mistura contendo os excipientes, as impurezas fortificadas e o composto activo.

Considera-se o método selectivo pois verifica-se que não há qualquer tipo de interferência no pico do composto activo, nem na forma nem na área do pico. Os picos apresentam-se todos bem separados nos tempos de retenção esperados.

8.2.3 Precisão do sistema

Como referido anteriormente a precisão do sistema avalia a variabilidade entre várias injeções, neste sentido, foi avaliada a análise de seis injeções consecutivas de uma solução padrão do composto X, a uma concentração real de 0,002mg/ml, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 19.

Tabela 19- Áreas obtidas das seis injeções da solução padrão a uma concentração de 0,002mg/mL.

Injeções	Área do pico	RF
1	42223	$2,122 \times 10^{+7}$
2	42221	$2,122 \times 10^{+7}$
3	42487	$2,135 \times 10^{+7}$
4	42493	$2,135 \times 10^{+7}$
5	42491	$2,135 \times 10^{+7}$
6	42603	$2,141 \times 10^{+7}$
Average		$2,13 \times 10^{+7}$
RSD(n=6)		0,38%

Esta análise, permite avaliar a resposta do sistema cromatográfico quando é injectada uma mesma solução várias vezes consecutivas. No caso das impurezas o que a farmacopeia Europeia recomenda é que o RSD dos vários valores não difira mais de 10%, assim, tendo em conta que o valor do RSD obtido é de 0,38% pode-se concluir que o sistema é preciso neste método analítico.

8.2.4 Eficiência do sistema

Esta análise permite avaliar a resposta de alguns factores do método analítico, tais como a resolução, o factor de arrastamento e o número de pratos teóricos. Para isso foi analisada uma solução padrão a uma concentração de 0,5% ($2,0 \times 10^{-3}$ mg/mL) injectada seis vezes de acordo com o método analítico adoptado.

Os resultados obtidos das seis injeções estão apresentados na Tabela 20, os parâmetros analisados nesta análise foi o factor de arrastamento e o número de pratos teóricos, contudo foram também apresentados os valores da resolução e do tempo de retenção de forma a verificar se os parâmetros da conformidade do sistema estavam de acordo com o estabelecido pelo procedimento.

Tabela 20 - Resultados obtidos nas seis injeções do padrão a 0,5%.

Concentração (%)	Area	Factor de arrastamento	Pratos Teóricos	Resolução	Tempo de retenção
100% inj 1	120767	1,10	4750	6,57	4,288
100% inj 2	120179	1,10	4741	6,57	4,287
100% inj 3	120206	1,10	4747	6,57	4,289
100% inj 4	120356	1,10	4743	6,56	4,290
100% inj 5	120574	1,10	4729	6,56	4,289
100% inj 6	120529	1,10	4737	6,57	4,289
Média	120435	1,10	4741	6,57	4,289
RSD	0,19%	0%	0,16%	0,08%	0,02%
Limite	≤ 10%	Max. 2	Min. 2000	≥ 5	3,8±20 %

Através dos resultados apresentados na Tabela 20, pode-se concluir que o sistema permite obter resultados coerentes, estando dentro dos limites mínimos para os parâmetros analisados. A análise das seis injeções feitas com uma solução padrão consistiu na verificação do RSD das áreas obtidas, cujo valor 0,19% corresponde ao limite permitido, ou seja, máximo de 10%. Outros parâmetros foram analisados, tais como, o factor de arrastamento, que deve ser inferior a 2, o número pratos teóricos, que deve ser superior a 2000, e o tempo de retenção, que deverá ser $3,8 \pm 20\%$. A avaliação dos resultados dos diferentes parâmetros conclui-se que o sistema responde de maneira eficiente, ao apresentar um factor de arrastamento de 1,10, mais de 4000 pratos teóricos (cerca de 4741), um tempo de retenção próximo dos 4,29 minutos e uma resolução entre os picos do composto X e impureza igual a 6,57, ou seja, superior ao limite mínimo pré-estabelecido (5). Estes valores mostram que o sistema é capaz de apresentar resultados consistentes quando submetido a várias injeções consecutivas de uma mesma solução.

8.2.5 LOD e LOQ

O limite de detecção representa a menor quantidade do composto na amostra que pode ser detectada mas não necessariamente quantificada com o valor exacto.

O limite de quantificação foi estabelecido como sendo a concentração do analito de interesse que pode ser medida com a precisão e exactidão estabelecida.

Nesta análise os limites de detecção e de quantificação foram determinados baseados na razão sinal/ruído. Para tal, foram preparadas várias soluções contendo diferentes concentrações de substância activa e calculadas as respectivas razões sinal/ruído como explicado de seguida, até ser encontrada a concentração a que corresponda uma razão próxima de 3 e 10, respectivamente.

A razão do sinal/ruído foi calculada para todas estas soluções de igual forma. Nos cromatogramas obtidos, foi determinada a largura a meia altura do pico do composto X e converte-se a medida de cm para tempo tendo em conta a escala do cromatograma. Este tempo foi multiplicado por um factor 20 com o intuito de se determinar o intervalo de tempo no cromatograma, no qual é avaliada a razão sinal/ruído.

A Figura 31 representa um cromatograma a partir do qual se determinou a razão sinal/ruído, enquanto a Figura 32 ilustra o cálculo da razão sinal/ruído da solução de concentração $1,2 \times 10^{-5}$ mg/ml.

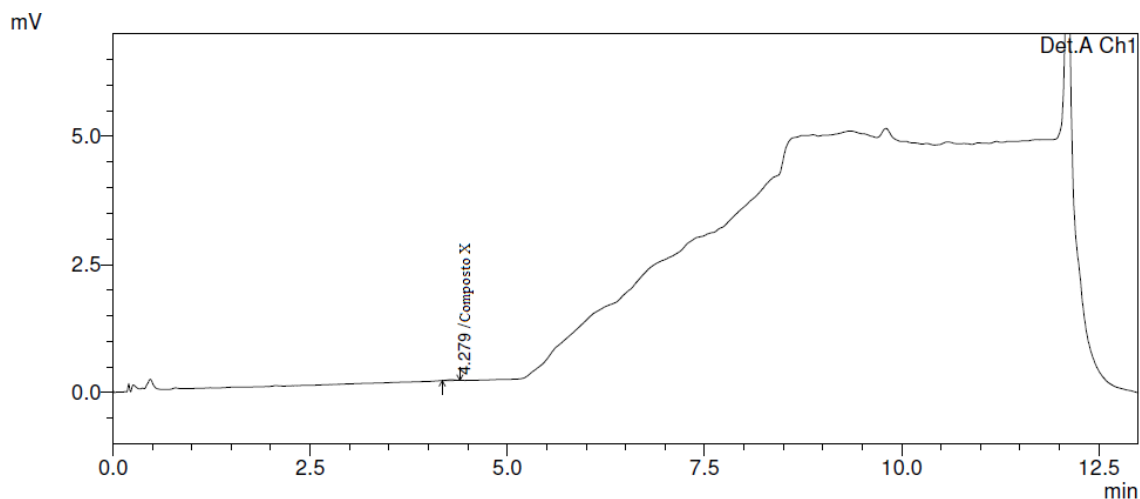


Figura 31 - Cromatograma auxiliar no cálculo da Razão sinal/ruído para o limite de detecção.

De seguida é marcado o sinal do ruído, h , tendo em especial atenção à frente de solvente, e determina-se a altura do pico, H . Depois aplica-se a seguinte equação de forma a determinar a razão sinal/ruído, como exemplificado na Figura 32.

$$\text{Razão sinal/ruído} = \frac{2H}{h}$$

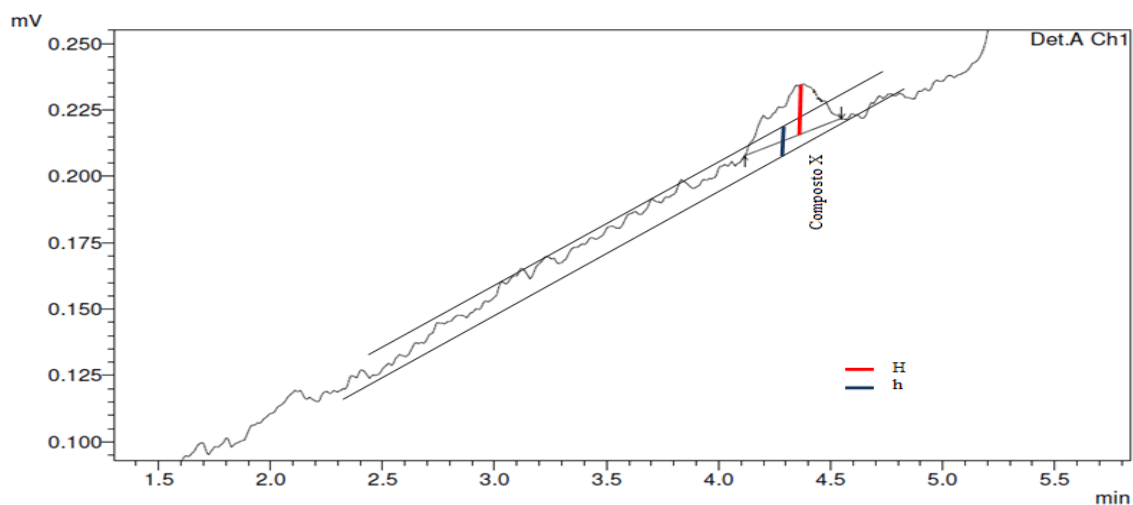


Figura 32 - Razão sinal/ruído da concentração do limite de detecção.

A razão sinal ruído foi determinada procedendo-se de igual forma para todas as soluções preparadas nas diferentes concentrações. Na tabela 21 são apresentadas as concentrações das soluções preparadas e também os resultados correspondentes para a razão sinal ruído.

Tabela 21 - Resultados relativos à análise da razão sinal/ruído do Limite de detecção.

Concentração (%)	Concentração (mg/ml)	Razão S/R
0,007	$2,8 \times 10^{-5}$	13,2
0,006	$2,4 \times 10^{-5}$	11,1
0,005	$2,0 \times 10^{-5}$	8,5
0,004	$1,6 \times 10^{-5}$	6
0,003	$1,2 \times 10^{-5}$	4,7

A razão sinal/ruído serve apenas como uma linha de orientação, pelo que pode ser superior a 3, no caso do limite de detecção, uma vez que não afecta os objectivos estabelecidos. Observando os resultados apresentados da razão S/R, da Tabela 22 conclui-se que a solução que determina o LD é a que tem uma concentração $1,2 \times 10^{-5}$ mg/ml.

Para a determinação do limite de quantificação, foram preparadas soluções com concentrações superiores ao limite de detecção. Observando a Tabela anterior, pode-se concluir que a solução de concentração $2,4 \times 10^{-5}$ mg/ml é que determina o limite de quantificação.

A precisão e o rigor dos resultados para o limite de quantificação devem ser verificados para o composto X, neste sentido, foram preparadas e injectadas três soluções independentes na concentração definida como sendo LQ, sendo para isso necessário a aplicação do método analítico. Segundo o procedimento analítico deve ser sempre efectuada injeção de brancos, uma solução de resolução e uma calibração de duas soluções padrão (neste caso cinco injeções de um padrão e uma injeção simples do outro padrão), antes da injeção das soluções preparadas nas concentrações do limite de quantificação.

Os resultados da calibração devem obedecer aos limites de especificação, sendo o desvio padrão relativo das seis injeções inferior ou igual a 5% e a recuperação deve ser

entre 95% e 105%. Neste caso pode-se verificar que estes limites são cumpridos tendo-se obtido um RSD de 0,81% e uma recuperação de 101,9%.

Verificada a conformidade do sistema, foram preparadas três soluções independentes a uma concentração no limite de quantificação e foram injectadas em duplicado.

Tabela 22 - Resultados relativos à análise da recuperação do limite de quantificação.

Nível de Concentração	Concentração real (mg/mL)	Área	RF	Recuperação (%)	Média da recuperação (%)	RSD (%)
0,006%	2,398×10 ⁻⁵	512	20677304,49	101,96	107,34	2,14
	2,398×10 ⁻⁵	566	22858113,95	112,72		
	2,476×10 ⁻⁵	541	21848479,94	104,32	104,32	
	2,476×10 ⁻⁵	541	21848479,94	104,32		
	2,398×10 ⁻⁵	561	22656187,15	111,72	108,84	
	2,398×10 ⁻⁵	532	21485011,7	105,95		

Uma recuperação aceitável deve estar compreendida entre 85% e 115%, e o RSD das recuperações deve ser inferior a 10%.

As recuperações obtidas são apresentadas na Tabel 22.

Segundo os resultados obtidos, pode-se verificar que as recuperações obtidas (104.3; 107.34 e 108.8) e o respectivo RSD correspondem aos limites anteriormente especificados, ou seja, conclui-se que é possível quantificar de forma exacta e precisa 0,006% de impureza na forma farmacêutica.

Assim, o limite de quantificação é 0,006%, correspondendo ao limite estabelecido, ou seja, ser inferior ao limite para reportar (0,10%). Nesta análise a recuperação do padrão de controlo foi de 99,8% logo, foi considerada válida toda a análise, demonstrando que o limite de quantificação definido pode ser quantificado com precisão.

8.2.6 Linearidade

Neste método também foi necessário verificar a linearidade ao longo de toda a gama de trabalho, neste sentido, foram preparadas várias soluções a concentrações diferentes, nomeadamente a LOQ, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6% e 1%. Estas soluções foram preparadas a

partir de duas soluções independentes de concentrações 0,002mg/mL e 4mg/mL, como apresentado na Tabela 23 e foram analisadas com injeção dupla.

Tabela 23 - Resultados obtidos no estudo da linearidade.

Solução stock utilizada	Concentração (%)	Concentração final (mg/mL)	Area (#1)	Area (#2)	Média (n=2)	RF
#1	0,006%	$2,402 \times 10^{-5}$	527	503	515	$2,144 \times 10^{+7}$
#1	0,300%	$1,201 \times 10^{-3}$	24742	24671	24707	$2,057 \times 10^{+7}$
#1	0,400%	$1,602 \times 10^{-3}$	33117	33012	33065	$2,064 \times 10^{+7}$
#2	0,500%	$2,022 \times 10^{-3}$	40959	40922	40941	$2,025 \times 10^{+7}$
#2	0,600%	$2,426 \times 10^{-3}$	48895	48945	48920	$2,016 \times 10^{+7}$
#2	1,000%	$4,043 \times 10^{-3}$	81467	81629	81548	$2,017 \times 10^{+7}$
					Média RF	$2,054 \times 10^{+7}$
					RSD	2,37 %

Depois de obtidos os resultados apresentados na Tabela 23, procedeu-se seguidamente à construção do gráfico da área versus concentração, como representado na Figura 33.

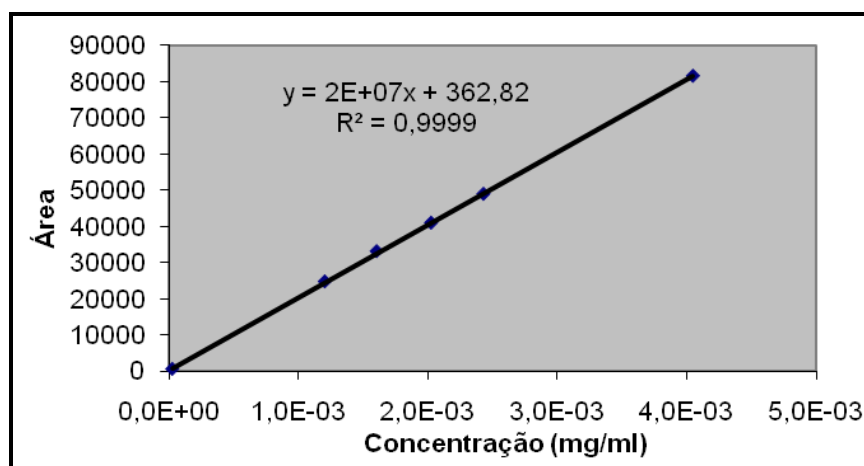


Figura 33 - Gráfico obtido dos resultados das áreas vs concentração das soluções preparadas.

Obteve-se a equação da recta $y=2 \times 10^{+7}x + 362,82$ e um coeficiente de correlação de 0,9999 (superior a 0,99), indicando uma boa relação entre a área e a concentração do princípio activo X.

O declive da recta, permite ter uma noção sobre a sensibilidade do método, neste caso obteve-se um declive de 362,82.

Os resultados das soluções padrão apresentam-se lineares na gama de concentração, desde a concentração mais baixa analisada $2,402 \times 10^{-5}$ mg/ml até à mais concentrada $4,043 \times 10^{-3}$ mg/ml.

Foi também avaliado o grau de proximidade de zero relativamente à resposta do limite de aceitação $2,022 \times 10^{-3}$ mg/ml, tendo sido obtido um valor de 0,89%. Atendendo a que o limite de aceitação para este desvio à intercepção no eixo dos y's deve ser inferior a 10%, pode considerar-se que o desvio obtido é aceitável para a gama de trabalho.

Considerando os resultados obtidos, pode concluir-se que o método analítico é capaz de gerar resultados directamente proporcionais à concentração do composto X no solvente no intervalo da gama de trabalho testada (entre $2,402 \times 10^{-5}$ mg/ml e $4,043 \times 10^{-3}$ mg/ml).

8.2.7 Estabilidade das soluções

Geralmente as soluções analíticas são usadas num intervalo de tempo relativamente curto, no qual o composto em análise deve permanecer praticamente inalterável. A estabilidade das soluções é avaliada através do cálculo do desvio da resposta da análise de uma amostra num momento t relativamente à resposta inicial em t_0 , este desvio não pode ser superior a 2%.

Foi avaliada a estabilidade de uma solução padrão do composto X e a estabilidade de uma solução da fórmula reconstituída, esta última serviria para avaliar o comportamento de uma amostra numa análise de rotina. As soluções foram injectadas em triplicado e armazenadas a uma temperatura de 4°C para serem reanalisadas posteriormente. A estabilidade da solução padrão do composto X foi avaliada aos tempos 0h, 24h e 48h, enquanto a solução da fórmula reconstituída foi avaliada aos tempos 0h, 1,5h, 3h, 4,5h e 6h.

Os resultados da estabilidade da solução padrão encontram-se apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Resultados da estabilidade da solução padrão do composto X.

Amostras	t = 0 h		t = 24 h		t = 48 h	
	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
#1	43924	$2,164 \times 10^{+7}$	43602	$2,148 \times 10^{+7}$	43820	$2,159 \times 10^{+7}$
#2	43738	$2,103 \times 10^{+7}$	43897	$2,111 \times 10^{+7}$	43921	$2,112 \times 10^{+7}$
#3	43252	$2,110 \times 10^{+7}$	42907	$2,093 \times 10^{+7}$	43314	$2,113 \times 10^{+7}$
	Média	$2,126 \times 10^{+7}$	Média	$2,118 \times 10^{+7}$	Média	$2,118 \times 10^{+7}$
			Desvio	0,39%	Desvio	0,84%

A solução padrão do composto X considera-se estável num período de 48 h, uma vez que o desvio entre as respostas 24 horas depois da primeira injeção foi de 0,39% e passadas 48 horas o desvio foi de 0,84%.

No caso da solução da fórmula reconstituída foi feita uma avaliação não só do composto X mas também de todas as impurezas conhecidas, de forma a garantir que durante o decorrer da análise de rotina nenhuma impureza é quantificada fora do seu período de estabilidade. Os resultados obtidos para a estabilidade da solução da fórmula reconstituída estão apresentados de seguida, tendo em conta o composto X e as impurezas conhecidas e quantificadas (A, C, D e E). Na Tabela 25 são apresentados os resultados da análise da estabilidade para o composto X, nas restantes Tabelas 26, 27, 28 e 29 encontram-se os resultados quanto às impurezas A, C, D e E, respectivamente.

Tabela 25 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída.

Amostras		t = 0 h		t = 1,5 h		t = 3 h		t = 4,5 h		t = 6 h	
		Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
Composto X	#1	8619490	$2,095 \times 10^{+7}$	8631750	$2,098 \times 10^{+7}$	8614935	$2,094 \times 10^{+7}$	8611398	$2,093 \times 10^{+7}$	8638488	$2,099 \times 10^{+7}$
	#2	8121407	$2,045 \times 10^{+7}$	8119864	$2,044 \times 10^{+7}$	8109235	$2,042 \times 10^{+7}$	8102520	$2,040 \times 10^{+7}$	8107225	$2,041 \times 10^{+7}$
	#3	8773973	$2,094 \times 10^{+7}$	8760500	$2,091 \times 10^{+7}$	8744683	$2,087 \times 10^{+7}$	8734921	$2,084 \times 10^{+7}$	8727278	$2,083 \times 10^{+7}$
		Média	$2,078 \times 10^{+7}$	Média	$2,077 \times 10^{+7}$	Média	$2,074 \times 10^{+7}$	Média	$2,072 \times 10^{+7}$	Média	$2,074 \times 10^{+7}$
				Desvio	0,01%	Desvio	0,18%	Desvio	0,26%	Desvio	0,16%

Tabela 26 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza A.

		t = 0 h		t = 1,5 h		t = 3 h		t = 4,5 h		t = 6 h	
Amostras		Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
Impureza A	#1	6053	$2,851 \times 10^{+6}$	6405	$3,017 \times 10^{+6}$	6645	$3,130 \times 10^{+6}$	6957	$3,276 \times 10^{+6}$	7266	$3,422 \times 10^{+6}$
	#2	5381	$2,534 \times 10^{+6}$	5464	$2,573 \times 10^{+6}$	5697	$2,683 \times 10^{+6}$	5840	$2,750 \times 10^{+6}$	5979	$2,816 \times 10^{+6}$
	#3	5852	$2,756 \times 10^{+6}$	5998	$2,825 \times 10^{+6}$	6157	$2,900 \times 10^{+6}$	6287	$2,961 \times 10^{+6}$	6446	$3,036 \times 10^{+6}$
	Média		$2,714 \times 10^{+6}$	Média	$2,805 \times 10^{+6}$	Média	$2,904 \times 10^{+6}$	Média	$2,996 \times 10^{+6}$	Média	$3,091 \times 10^{+6}$
				Desvio	-3,31%	Desvio	-6,78%	Desvio	-9,88%	Desvio	-13,01%

Tabela 27 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza C.

		t = 0 h		t = 1,5 h		t = 3 h		t = 4,5 h		t = 6 h	
Amostras		Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
Impureza C	#1	15093	$8,751 \times 10^{+6}$	15060	$8,731 \times 10^{+6}$	14983	$8,687 \times 10^{+6}$	15397	$8,927 \times 10^{+6}$	15503	$8,988 \times 10^{+6}$
	#2	14348	$8,319 \times 10^{+6}$	14527	$8,422 \times 10^{+6}$	14374	$8,333 \times 10^{+6}$	14639	$8,487 \times 10^{+6}$	14378	$8,336 \times 10^{+6}$
	#3	15109	$8,760 \times 10^{+6}$	15089	$8,748 \times 10^{+6}$	15057	$8,730 \times 10^{+6}$	15009	$8,702 \times 10^{+6}$	14960	$8,673 \times 10^{+6}$
	Média		$8,610 \times 10^{+6}$	Média	$8,634 \times 10^{+6}$	Média	$8,583 \times 10^{+6}$	Média	$8,705 \times 10^{+6}$	Média	$8,666 \times 10^{+6}$
				Desvio	-0,28%	Desvio	0,31%	Desvio	-1,10%	Desvio	-0,65%

Tabela 28 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza D.

		t = 0 h		t = 1,5 h		t = 3 h		t = 4,5 h		t = 6 h	
Amostras		Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
Impureza D	#1	11746	$6,862 \times 10^{+6}$	11993	$7,006 \times 10^{+6}$	11779	$6,881 \times 10^{+6}$	12015	$7,019 \times 10^{+6}$	12058	$7,044 \times 10^{+6}$
	#2	11138	$6,506 \times 10^{+6}$	11321	$6,613 \times 10^{+6}$	11189	$6,536 \times 10^{+6}$	11056	$6,459 \times 10^{+6}$	11265	$6,581 \times 10^{+6}$
	#3	11633	$6,795 \times 10^{+6}$	11845	$6,919 \times 10^{+6}$	11888	$6,945 \times 10^{+6}$	11676	$6,821 \times 10^{+6}$	11702	$6,836 \times 10^{+6}$
	Média		$6,721 \times 10^{+6}$	Média	$6,846 \times 10^{+6}$	Média	$6,787 \times 10^{+6}$	Média	$6,766 \times 10^{+6}$	Média	$6,820 \times 10^{+6}$
				Desvio	-1,84%	Desvio	-0,98%	Desvio	-0,67%	Desvio	-1,46%

Tabela 29 - Resultados da estabilidade da solução da fórmula reconstituída para a impureza E.

		t = 0 h		t = 1,5 h		t = 3 h		t = 4,5 h		t = 6 h	
Amostras		Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF	Área Média	RF
Impureza E	#1	40521	$7,629 \times 10^{+6}$	40493	$7,623 \times 10^{+6}$	40507	$7,626 \times 10^{+6}$	40263	$7,580 \times 10^{+6}$	40968	$7,713 \times 10^{+6}$
	#2	38026	$7,159 \times 10^{+6}$	38330	$7,216 \times 10^{+6}$	37989	$7,152 \times 10^{+6}$	38012	$7,156 \times 10^{+6}$	38365	$7,223 \times 10^{+6}$
	#3	37604	$7,079 \times 10^{+6}$	37232	$7,009 \times 10^{+6}$	36236	$6,822 \times 10^{+6}$	37043	$6,974 \times 10^{+6}$	36096	$6,795 \times 10^{+6}$
	Média		$7,289 \times 10^{+6}$	Média	$7,283 \times 10^{+6}$	Média	$7,200 \times 10^{+6}$	Média	$7,237 \times 10^{+6}$	Média	$7,244 \times 10^{+6}$
				Desvio	0,08%	Desvio	1,23%	Desvio	0,72%	Desvio	0,62%

Dos resultados apresentados pode-se concluir que a estabilidade das soluções da fórmula reconstituída está apenas dependente da impureza A, pois verificou-se logo passado 1,5 horas da primeira injeção um desvio superior ao limite (2%), desvio este que vai aumentando ao longo do tempo. Qualquer outra impureza ou o composto X não apresentam desvio superior a 2% considerando-se estáveis durante as 6 horas que foram avaliadas.

Assim sendo, pode-se concluir que de forma a garantir que a impureza A é quantificada o mais próximo possível da sua quantidade real, em rotina, as amostras terão de ser injectadas logo após à sua preparação.

CAPÍTULO 9 - CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como principal objectivo planear e executar a validação do método analítico, aplicado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, com o intuito de quantificar com exactidão e precisão o composto Y e as impurezas presentes num produto X. Deste modo tornou-se crucial testar e validar estes métodos para nos certificarmos que é adequado para análise pretendida e que pode ser posteriormente aplicado em análises de rotina no Controlo de Qualidade.

A validação de um método é realizada de forma a assegurar que as metodologias analíticas são rigorosas, precisas, lineares e selectivas numa gama de valores nos quais o analito será analisado. Assim, um processo de validação bem definido e documentado fornece uma evidência objectiva de que o sistema e o método são adequados para o fim pretendido.

Na validação do parâmetro da filtração, no método de conteúdo do composto Y, concluiu-se que os filtros PVDF Millipore e Nylon VWR são os mais adequados, tendo apresentado um menor desvio em relação à solução não filtrada.

Em relação à especificidade é possível concluir que não existe interferência do composto Y com o princípio activo X, nem com a mistura de excipientes necessários à formulação ou outros compostos similares que possam estar presentes. O método apresentou uma resposta linear, segundo a equação da recta: $y=6,51 \times 10^{+7}x + 7,20 \times 10^{+3}$, com uma correlação de 0,9999.

Na validação do método para a quantificação do composto Y, as amostras, soluções padrão e reagentes devem ser estáveis durante todo o tempo da análise, estando este parâmetro bastante relacionado com a temperatura. Concluiu-se que, as soluções padrão são estáveis durante pelo menos 72 horas, uma vez que o desvio padrão relativo entre as 0 horas e as 72 horas é de 0,81%, enquanto que soluções amostra apenas só são estáveis durante 24 horas, tendo-se verificado um desvio padrão relativo, às 48 horas, de 3,73%, ou seja, superior ao permitido pelo limite de especificação.

A precisão do sistema mede a extensão em que uma série de resultados do mesmo padrão, medidos sob as mesmas condições, são concordantes. Foi obtido um desvio padrão relativo inferior a 2% tanto para as soluções padrão como para as soluções amostra, concluindo-se que o método é preciso.

Os resultados obtidos na exactidão foram 100.15%, 100.24% e 100.00%, respectivamente para cada nível de concentração (60%, 100% e 140%), assegurando que o método é preciso e rigoroso.

No método de quantificação de impurezas foram também os filtros PVDF Millipore e Nylon VWR que apresentaram menores desvios em relação às soluções não filtradas.

A selectividade foi feita por comparação dos cromatogramas referentes a várias soluções, preparadas com excipientes, impurezas e o princípio activo, tendo-se verificado uma boa separação de todos os picos.

A análise da precisão do sistema apresentou um RSD de 0,38%, comprovando que os resultados das várias injeções de uma mesma solução não diferem significativamente entre si.

O limite de detecção foi obtido a uma concentração de $2,0 \times 10^{-5}$ mg/ml (0.003%), enquanto que o limite de quantificação foi obtido a uma de $2,4 \times 10^{-5}$ mg/ml (0.006%). Foi determinada a recuperação dos valores a uma concentração de $2,4 \times 10^{-5}$ mg/ml, tendo-se obtido 107.34%, 104.32% e 108.84%, com um desvio padrão relativo de 2,14%. Esta análise permitiu concluir que é possível quantificar com precisão e exactidão uma solução com 0,006% de impureza na forma farmacêutica, e que corresponde ao limite, ou seja, ser inferior ao limite para reportar (0.10%).

A linearidade do método analítico é a capacidade de obter resultados directamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma gama de valores. Foi obtida a equação da recta $y = 2 \times 10^7 x + 362,82$, com um coeficiente de correlação de 0,9999.

Concluiu-se que a estabilidade da solução padrão é de apenas 24 horas, enquanto as soluções da fórmula reconstituída devem ser injectadas logo depois de preparadas uma vez que não se obteve estabilidade da impureza A a partir da análise feita 1,5 horas depois de preparadas as soluções.

Neste trabalho pretendeu-se validar dois métodos analíticos que seriam posteriormente aplicados em ensaios de rotina no controlo de qualidade. Dos resultados apresentados pode-se concluir que os dois métodos validados são estáveis, selectivos e dando respostas exactas, precisas e lineares quando analisados os respectivos compostos na gama de concentração de trabalho.

BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.fda.gov>, consultado a 17-08-2010.
2. Signore, Andrew A. and Jacobs, Terry, (2005), *Good Desing Practices for GMP Pharmaceutical Facilities*, Taylor & Francis, USA.
3. *International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, 2005.
4. <http://www.dre.pt/>, consultado a 24 -08-2010.
5. Causon, R. (1997), "Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion", Journal of Chromatography B, 689, 175-180.
6. *Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation*, (2002), (CITAC/EURACHEM), www.eurachem.ul.pt/, consultado em 13-05-2009.
7. Fiorenzano, A. R.; Riesemberg, C. C.; Foltran, L.; Scotti, R. I.; Moraes, S. A. G.; MANSO, F. C.; Bazotte, R. B. (2006), "Aspectos clínicos e farmacológicos da associação sinvastatina-ezetimiba", Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama, vol. 10, nº 3, 181-183.
8. D. L. Nelson and M. M. Cox, (2000), Lehninger Principles of Biochemistry, third edition, Worth Publishers, New York.
9. <http://www.manualmerck.net> , consultado a 21-08-2010.
10. Mullen, P. J.; Lu" scher B.; Scharnagl H.; Kra"henbu" hl, S.; Brecht, K. (2010) "Effect of simvastatin on cholesterol metabolism in C2C12 myotubes and HepG2 cells, and consequences for statin-induced myopathy", Biochemical Pharmacology, 79, 1200–1209.
11. Vaughan, C. J.; Gotto, A. M.; "Update on Statins: 2003", Journal of the American heart association, 886-892.
12. Tobert, J. A. (2003), "Lovastatin and Beyond: the history os the HMG-CoA redutase inhibitors", Nature Reviews, vol. 2, 517-526.
13. Paoletti, R., Corsini, A., Bellosta, S. (2002), "Pharmacological interactions of statins", Atherosclerosis Supplements, 3, 35-40.

14. Gaw, A.; Packard, C. J.; Shepherd, J. (2000), "*Statins: the HMG CoA reductase inhibitors in perspective*", Martin Dunitz Ltd.
15. Igel, M.; Sudhop, T.; VonBergmann, K. (2001), "*Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (Statin)*", European Journal of Clinical Pharmacology, 57, 357-364.
16. http://www.forumsci.co.il/HPLC/ion_chrm.html, consultado a 01.06.2010.
17. Rowl, C. R.; Sheskey, P. J.; Quinn, M. E., "Handbook of Pharmaceutical Excipients"; sixth edition; Pharmaceutical Press; 2009.
18. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, *Impurities in new drug substances Q3A (R2)*, 4th version, Outober, 2003.
19. Épshtein N. A. (2004), "*Struture of chemical compounds, methods of analysis and process control*", Pharmaceutical Chemistry Journal. Vol.38 N°4 212-228.
20. Joel K. Swadesh (2001), HPLC Practical and industrial applications, second edition, CRC Press LLC.
21. Forgács, E. and T. Cserhádi (1997), Molecular Basis of Chromatographic Separation, New York, CRC Press, Boca Raton.
22. Raghavan. R, Joseph J. C. (2007), "*Chromatographic Methods of Analysis: High Performance Liquid Chromatography*", Encyclopedia of Pharmaceutical Thechnology, 526-537.
23. McMaster, M. C. (1994), "*HPLC a practical user's guide*", New York, VCH.
24. <http://www.pharmainfo.net/reviews/introduction-analytical-method-development-pharmaceutical-formulations>, consultado a 10.06.2010.
25. Leadbetter, M. G. (7, November, 2005), "*Guidance for Industry, Validation of Analitical Procedures for Type C Medicated Feeds, U. S. Departement of Helth and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, Rockville*".
26. Crosby, N. T., J. A. Day, et al. (1995), "*Quality in the Analytical Chemestry Laboratory*", England, Chchester John Wiley & Sons.
27. *European Pharmacopoeia*, 6.0, 4th Edition, Chromatographic separation techniques.

28. Dolan J W. (2008), "*The Perfect Method, Part 1: What is your goal?*", LCGC ASIA PACIFIC, Volume 11, Issue 1.
29. www.Labvirtual.eq.uc.pt, consultado a 13-05-2009.
30. Dolan, J. W. (2002), "*Peak Tailing and Resolution*", LCGC Asia Pacific, LC Troubleshooting Editor, vol. 5, nº 3, 16-20.
31. http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527323015_c01.pdf, consultado a 19-08-2010.
32. Bressolle, F., M. Bromet-Petit, et al. (1996), "*Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics*", Journal of Chromatography B 686: 3-10.
33. *International Conference on Harmonization, Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2)*, 2003.
34. Shah, V. P., K. K. Midha, et al. (2000), "*Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress*", Pharmaceutical Research, 17, 12, 1551-1557.
35. Rosing, H., W. Y. Man, et al. (January 2000), "Bioanalytical liquid chromatographic method validation", A review of current practices and procedures.
36. Ribani, M. (2004), "*Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos*", Química Nova, vol. 27, nº 5, 771-780.
37. Roymond P. W. Scott (1994), *Liquid Chromatography for the Analyst*, Chromatographic Science Serie, Volume 67, Mercel Dekker, Inc.
38. Peters, F. T. and H. H. Maurer (2002). "*Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review*", Accreditation and Quality Assurance, **7**: 441-449.
39. Miller, J. N. and J. C. Miller (2000), Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 4th Edition, England, Personal Education Limited